DEPARTAMENTO DE PROMOÇÃO E COORDENAÇÃO DE PESQUISAS

Organização Pan-Americana da Saúde
525 23rd Street, N.W.
Washington, D.C., USA

Programa de Pesquisas de doenças infecciosas
na Região Amazônica

CURSO INTERNACIONAL EM HISTOTECNOLOGIA

Universidade Federal do Pará
Belém, Brasil

10-19 June 1974

Ref: RD 13/7

Em colaboração com: Ministério da Educação e Cultura, Universidade Federal do Pará, Ministério da Saúde, Instituto Evandro Chagas e Instituto de Patologia das Forças Armadas.

DEPARTAMENTO DE PROMOÇÃO E COORDENAÇÃO DE PESQUISAS

Organização Pan-Americana da Saúde
525 23rd Street, N.W.
Washington, D.C., USA

Programa de Pesquisas de doenças infecciosas
na Região Amazônica

CURSO INTERNACIONAL EM HISTOTECNOLOGIA

Universidade Federal do Pará
Belém, Brasil

10-19 June 1974

Ref: RD 13/7

Em colaboração com: Ministério da Educação e Cultura, Universidade Federal do Pará, Ministério da Saúde, Instituto Evandro Chagas e Instituto de Patologia das Forças Armadas.

O primeiro Curso de Histotecnologia que se realiza dentro do Programa de Pesquisas de Doenças Infecciosas da Região Amazônica, se destina a atualizar e reforçar a infraestrutura do setor da patologia nos organismos participantes do projeto Brasil/0114, bem como de outras instituições científicas da região.

Para a orientação dos trabalhos e como material de referência futura, foi preparada uma série de documentos que se reuniram sob o nome "PRÁTICAS DE HISTOTECNOLOGIA".

Os diferentes métodos de coloração descritos no capítulo "Técnicas de rotina" servirão de guia para os trabalhos práticos a serem desenvolvidos durante o curso.

Sob o título "Anotações Práticas" foram reunidas observações de utilidade e aplicação imediata na rotina de um laboratório de histopatologia.

Agradecemos a eficiente cooperação recebida do senhor Lee G. Luna, Chefe da Divisão de Laboratórios de Histopatologia, A.F.I.P., na elaboração dos dois capítulos acima mencionados.

PRÁTICAS DE HISTOTECNOLOGIA se completa com várias listas de materiais (vidraria, reagentes, corantes, equipamentos diversos) à guisa de orientação para a instalação de um laboratório de anatomia patológica para atender à rotina diagnóstica em histopatologia, citologia e autópsia.

As listas fornecidas não pretendem ser completas ou exaustivas porém representam a etapa inicial para a instalação de um laboratório de anatomia patológica.

Informação adicional será fornecida a pedido dos interessados.

Os nomes de fabricantes, firmas comerciais ou distribuidores mencionados no texto, não indicam uma preferência ou recomendação da Organização Pan-Americana da Saúde sobre outros de natureza similar e que não foram mencionados.

Os comentários, críticas e sugestões recebidos serão úteis na complementação deste trabalho inicial e serão incorporados em futuras edições de "PRÁTICAS DE HISTOTECNOLOGIA".

H. Torloni, M.D.
Department of Research Development
and Coordination
PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION
525 23rd Street N.W.
Washington, D.C. 20037

INDICE

A

Acido acético, 3%, 63
Acido acético, 12%, 67
Acido acético, glacial, 1%, 14
Acido clorídrico, normal, 60
Acido clorídrico, 5%, 68
Acido clorídrico, 10%, 38
Acido clorídrico, 20%, 40
Acido clorídrico fosfatado, 65
Acido crômico, 4%, 42
Acido fosfomolíbdico, 1%, 51
Acido fosfomolíbdico, 10%, 27
Acido fosfotúngstico, 30
Acido nítrico, 73
Acido oxálico, 2%, 34
Acido oxálico, 5%, 22
Acido periódico, 0.5%, 60
Acido pícrico, 3
Acido pícrico, sol. aquosa, 2%, 47
Acido pícrico, sol. saturada, 47
Acido pícrico, sol. alcoolica, 51
Acido sulfúrico, 74
Agua acética, 18
Agua acidulada, 53, 56
Álcool, 70%, 32
Álcool ácido, 49,86
Alumen de amônio, 9
Alumen de potássio, 9
Amarelo metanil, 0,25%, 42
Anilina, cromotropo, 2R, 16,89
Anilina fucsina ácida, 51
Artefatos, 78,81,82,83,84
Autópsia, material, 111-112
Azul alciano, 1%, 63
Azul alciano, pH 0,4, 65
Azul alciano, pH 1,0, 65
Azul alciano, pH 2.5, 63
Azul de anilina, 35
Azul de metileno, 49
Azul rápido, luxol, 0,1%, 32
Azur II, Eosina, 18

B

Bicromato de potássio, 74
Bisulfito de sódio, 1%, 45
Bodian, método, 34
Borax, 5% , 44
Bouin, solução, 5

C

Carbonato de lítio, 0,05%, 32
Carbonato de lítio, 1%, 86
Carnoy, sol., 5
Cloral, hidrato, 9
Cloreto férrico, 29%, 67
Cloreto de mercúrio, 2
Cloreto de ouro, 0,1%, 45
Cloreto de ouro, 0,2%, 25
Cloreto de ouro, 1,0%, 34
Colágeno, Van Gieson, 20
Coleman Feulgen, reagente, 42
Coloração Hematoxilina-eosina, 8,12,13,85
Corantes para laboratório, 95-100

Cresil de violeta, 0,1%, 32
Cresil de violeta, 2% , 37
Cromotropo 2R , 16,89

D

Diastáse, 69
Descalcificação, 72-77
Descalcificador, 72-73

E

Elásticas, fibras, 22
Eosina, sol. alcoólica, 1%, 11,88
Eosina Y sol. aquosa, 1%, 86
Eosina Azur (EA-50), 76
Eosina Floxina, 11,89
Equipamento p/ laboratório, 105-110
Espiroquetas, 53

F

Ferro coloidal, 67
Ferro (Gomori), 40
Ferro (Perls), 38
Ferrocianeto de K, 5% , 67
Ferrocianeto de K, 10% ,40
Feulgen Coleman, reagente ,42
Fibras colágenas (Van Gieson), 20
Fibras elásticas (Hart), 22
Fibras nervosas, 34
Fixação, 1
Floxina B, safranina, 91
Formalina, comum , 3
Formalina, 20%, 24
Formalina-acetato de Na, 4
Formalina-álcool-acética , 4
Formalina-brometo de amônio, 4
Formalina-cálcica, 4
Formalina metanol, 85
Formalina neutra, tamponada, 10%, 3
Fosfato de K, monobásico, 0,1M, 69
Fosfato de Na, bibásico, 0,1M ,69
Fosfato-tampão (pH 6), 69
Fosfotúngstica, hematoxilina, 30
Fucsina aldeídica , 42
Fucsina básica , 22
Fucsina resorcina , 22
Fungos (Gridley) , 42
Fungos (Grocott) , 44

G

Gelatina, 5%, 53
Gelatina de glicerina, 56
Giemsa, sol., 18
Glicogeno, (PAS), 60
Glicol propílico (Oil Red O),85%, 55
Goodpasture, sol., 47
Gomori (ferro), 40
Gomori (reticulina), 24
Gomori (tricrômico), 16
Gordura, 55
Gram, sol. iodada, 6
Gram negativos, método, 47
Gram positivos, método, 47
Gridley, método, 42
Grocott, método, 44

H

Harris, hematoxilina, 9
Hart, método (fibras elásticas), 22
Hematoxilina de Bullard, 85
Hematoxilina férrica, Weigert, 10
Hematoxilina fosfotúngstica (PTAH), 30
Hematoxilina de Harris, 9
Hematoxilina de Mayer, 9
Hialuronidase , 69
Hidrato de cloral, 9
Hidroquinona, 34,53
Hidróxido de amônio, 28%, 24,27
Hiposulfato de sódio, 2%, 25
Hiposulfato de sódio, 5%, 28

I

Iodo, sol., 6
Iodeto de potássio, 2,6

J

Jenner, sol. , 14

K

Kinyoun, método (álcool-ácido), 49
Klüver-Barrera, (mielina, neurônios), 32

L

Laqueur, corp. de Mallory , 51
Limpeza vidraria , 74
Lisamina, vermelho rápido, 35
Lítio, carbonato 0,05% , 32
Lugol, 6
Luxol, 0,1% , 32

M

Material de autópsia, 111-112
Mayer, hematoxilina , 9
Mayer, mucicarmin, 58
May-Grünwald Giemsa, 14
McCallum-Goodpasture, 47
McManus (PAS), 60
Metabisulfito de K, 2%, 24
Metanamina, 3%, 44
Metanamina-nitrato de prata, 44
Metanil amarelo, 0,25%, 42
Metanol, 1
Método de (do),

azul alciano, pH-0,4, 65
azul alciano, pH-1,0, 65
azul alciano, pH-2,5, 63
Bodian (fibras nervosas), 34
Contrôle de descalcificação, 74
Descalcificação, 72
Digestão, 69
Gomori (ferro), 40
Gomori (reticulina), 24
Gomori (tricrômico), 16
Gridley (fungos), 42
Grocott (fungos), 44
Hart (fibras elásticas), 22
Kinyoun (álcool-ácido), 49

Klüver-Barrera (mielina), 32
Laqueur (corp. hialinos), 51
May Grünwald Giemsa, 14
May Grünwald Giemsa (rápido), 18
McCallum Goodpasture (Gram + & -), 47
McManus (glicogênio), PAS, 60
Mowry (mucopolissacarides), 67
Mucicarmin de Mayer (criptococus), 58
Mucopolissacarides , 63
Mucosubstâncias, 63
Óleo vermelho, 55
Papanicolau , 76
Perenyi (descalcificador), 73
Perls (ferro), 38
PTAH (s. nervoso-músculo), 30
Vogt (subst. Nissl) , 37
Warthin-Starry (espiroquetas) , 53
Wilder (reticulina) , 27
Ziegler , 92
Mielina , 32
Mucicarmin de Mayer , 58
Mucopolissacaride , 63
Mucosubstâncias , 63

N

Nervos, filetes , 34
Neurônios , 30
Nitrato de prata, 1%, 53
Nitrato de prata, 5%, 44
Nistrato de prata-amoniacal , 24,27
Nitrato de urânio, 1%, 27
Nissl, substância, 27

O

Óleo vermelho, 0,5%, 55
Ouro, cloreto, 0,1%, 45
Ouro, cloreto, 0,2%, 25
Ouro, cloreto, 1%, 34
Oxálico, ácido, 5%, 22
Oxido mercúrico, 9

P

Papanicolau, 76
PAS, 60
Periódico, ácido, 0,5%, 60
Perls, método, 38
Permanganato de K, 0,25%, 22
Permanganato de K, 0,5%, 24
Permanganato de K, 1%, 30
Pigmento de formol, remoção, 7
Pigmento malárico, remoção, 7
Pigmento melânico, remoção, 6,7
Pícrico, ácido, sol. saturada, 47
Prata amoniacal, (Gomori), 24
Prata amoniacal (Wilder), 27
Prata, nitrato, 1%, 53
Prata, nitrato, 5%, 44
Protargol, 1% , 34
PTAH, 30

R

Reagentes para laboratório, 95-100
Reagente de Feulgen-Coleman, 42
Reagente de Schiff , 60
Resorcina-fucsina, 22
Reticulina (Gomori), 24
Reticulina (Wilder), 27

. S

Safranina, *91*
Schiff, reagente, *60*
Sialidáse, *70*
Solução de ácido acético, 1%, *14*
ácido acético, 3%, *63*
ácido acético, 12%, *67*
ácido clorídrico, normal, *60*
ácido clorídrico, 5%, *68*
ácido clorídrico, 10%, *38*
ácido clorídrico, 20%, *40*
ácido clorídrico-fosfatada, *65*
ácido crômico, 4%, *42*
ácido fosfomolíbdico, 1%, *51*
ácido fosfomolíbdico, 10%, *27*
ácido fosfotúngstico, *30*
ácido oxálico, 2%, *32*
ácido oxálico, 5%, *22*
ácido periódico, 0,5%, *60*
ácido pícrico, sol. aquosa, 2%, *47*
ácido pícrico, sol. alcoólica, *51*
ácido pícrico, sol. saturada, *47*
água acidulada, *53,56*
álcool, 70%, *32*
álcool-ácido, *49,86*
amarelo-metanil, 0,25%, *42*
azul alciano, 1%, *63*
azul alciano (pH 0,4), *66*
azul de anilina, *35*
azul de metileno, *49*
azul rápido, luxol, 0,1%, *32*
azur II-eosina, *18*
bisulfito de sódio, 1%, *45*
borax, 5%, *44*
Bouin, *5*
Solução de carbonato lítio, 0,05%, *32*
carbonato de lítio, 1,0%, *86*
Carnoy, *5*
cloreto de ouro, 0,1%, *45*
cloreto de ouro, 0,2%, *25*
cloreto de ouro, 1%, *34*
cloreto férrico, 29%, *67*
diastáse, *69*
diferenciadora, *49*
eosina, sol. alcoolica, *11,88*
eosina-floxina, *11,89*
ferro coloidal (Müller), *67*
ferro coloidal (sol. de uso), *67*
ferro-amoniacal, 2%, *24*
ferrocianeto de K, 5%, *67*
ferrocianeto de K, 10%, *40*
ferrocianeto de K-HCL, *38, 40*
Feulgen-Coleman, *42*
formalina, 20%, *24*
formalina-acetato de Na, *4*
formalina-álcool-acética, *4*
formalina-brometo de amônio, *4*
formalina-cálcica, *4*
formalina, neutra, tampão, 10%, *3*
fosfato-ácido clorídrico, *65*
fosfato de K, monobásico, 0,1M, *69*
fosfato de Na, dibásico, 0,1M, *69*
fucsina-ácida anilina, *51*
fucsina aldeídica, *42*
fucsina fenólica (Kinyoun), *49*
fucsina-resorcina, *22*
gelatina, 5%, *53*
Giemsa, *14,18*
glicol propílico, 85%, *55*

Solução Goodpasture, 47
hialuronidase, 70
hidroquinona, 34,53
hidróxido de amônio, 28%, 24,27
iodo (Gram), 6
Jenner, 14
Lisamina (vermelho-rápido), 35
Lugol, 6
metabisulfito de K, 2%, 24
metanamina, 44
metanamina-nitrato de prata, 44
mucicarmin de Mayer, 58
nitrato de prata, 1%, 53
nitrato de prata, 2%, 53
nitrato de prata, 5%, 44
nitrato de urânio, 1%, 27
óleo vermelho, 0,5%, 55
óxiso de ferro coloidal, 67
permanganato de K, 0,25%, 22
permanganato de K, 0,5%, 24
permanganato de K, 1%, 30
prata amoniacal (Gomori), 24
prata amoniacal (Wilder), 27
protargol, 34
redutora (Bodian), 34
redutora (Warthin-Starry), 53
redutora (Wilder), 27
Safranina-alcoólica, 2%, 90
Schiff, 60
Sialidáse, 71
Sulfato férrico-amoniacal, 2%, 24
tampão (diastáse), 69
tampão (hialuronidáse), 70
Solução tampão (sialidáse), 70,71
tampão (Vogt), 37
tampão fosfatado (pH-6), 69
tartrazina, 35
tiosulfato (hipo) de Na, 2%, 25
tiosulfato (hipo) de Na, 5%, 28
tricrômica, 16
Van Gieson, 20
verde-luz, 0,2%, 45
verde-luz, 1%, 51
vermelho-rápido, lisamina, 35
vermelho-rápido nuclear, 40
violeta de cresil, 0,1%, 32
violeta de cresil, 2,0%, 37
Zenker, 5
Zenker-formol, 5
Solução descalcificadora, 72,73
Substancia de Nissl, 27

T

Tampão-fosfato (pH 6) (diastáse), 69
Tampão (hialuronidase), 70
Tampão (sialidáse), 70,71
Tampão (método de Vogt), 37
Tartrazina, sol., 35
Tiosulfato de Na, 2%, 25
Tiosulfato de Na, 5%, 28
Tricrômico de Gomori, 16

U

Urânio, nitrato, 1%, 27

V

Van Gieson, método, *20*
Van Gieson, sol., *20*
Verde-luz, 0,2% , *45*
Verde-luz, 1%, *51*
Vermelho rápido nuclear, *40*
Vermelho-rápido, lisamina, *35*
Vidraria, limpeza química, *74*
Vidraria para laboratório, *101-104*
Violeta de Cresil, 0,1%, *32*
Violeta de Cresil, 2%, *37*
Violeta de Genciana (Stirling), *47*
Vogt, método (substância de Nissl), *37*

W

Warthin-Starry, método, *53*
Weigert, hamatoxilina férrica, *10*
Wilder, método (reticulina), *27*

Z

Zenker, fixador, *5*
Zenker-formol, *5*
Ziegler, *93*

Bibliografia consultada na preparação de "PRÁTICAS DE HISTOTECNOLOGIA"

Luna, L.G. (Editor): Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology (3rd ed.) New York: Blakiston, Div., McGraw-Hill, 1968

Luna, L.G.: Personal notes and communications given at various courses in the U.S.A. and abroad (1974)

Lillie, R.D.: Histopathologic Technic and Practical Histochemistry (2nd ed.) New York: Blakiston, 1954

Preece, A.: Manual for Histologic Technicians (3rd ed.) Boston: Little & Brown and Company, 1972

Bowling, N.C. (editor): Histopathology Laboratory Procedures of the Pathologic Anatomy Branch of the National Center Institute. PHSP, U.S. Government Printing Office, 1967.

PRÁTICAS DE HISTOTECNOLOGIA

I Técnicas de rotina

II Anotações práticas

III Lista de materiais para:

- histotecnologia
- citologia
- autópsia

P R Á T I C A S D E

H I S T O T E C N O L O G I A

I Técnicas de rotina

FIXAÇÃO

A base de uma boa preparação histológica é a fixação completa e adequada do tecido a estudar. A fixação serve para:

1. prevenir as alterações post-mortem, tais como a putrefação e autólise;

2. preservar os vários componentes tissulares e celulares;

3. proteger, através do endurecimento, os tecidos moles no manuseio e processamento técnico posterior;

4. converter a consistência semifluida das células em uma consistência semi-sólida irreversível;

5. ajudar na diferenciação visual das estruturas, pela aplicação de métodos de corantes biológicos e químicos.

A fim de alcançar todos esses objetivos, devem-se colocar os tecidos no fixador imediatamente após sua retirada do corpo, ou tão cedo quanto possível após a morte.

A escolha do fixador depende dos estudos que se pretende fazer e das técnicas a serem usadas.

Os fragmentos a fixar devem ter espessura suficiente para permitir a penetração do fixador em tempo relativamente curto. Os blocos não devem ter mais de 4 mm de espessura. A relação volume tecido/volume fixador, deve ser de 1:10 a 1:20. Os fragmentos de músculo devem ser estirados em papel e fixados após 15-30 minutos, pois a fixação imediata causa contração e distorção das fibras musculares. O fixador mais usado é a solução de formalina, neutra, tampão. O tempo de fixação depende do tamanho do fragmento e do tipo de fixador. É importante compreender os efeitos da fixação, o tempo de fixação e o manuseio dos tecidos após a fixação. Por falta de cuidado no processamento posterior, muitos tecidos bem fixados podem dar preparados histológicos pouco satisfatórios.

CARACTERÍSTICAS DE ALGUNS FIXADORES

Formaldeído, formalina a 10%

Formaldeído, gás: O formaldeído é um gás incolor, inflamável e sufocante. É muito solúvel em água (até 55%) e é também solúvel em álcool e éter. É um reagente que se combina facilmente com muitas substâncias e se polimeriza também facilmente.

Formaldeído, solução (formalina, formol): É uma solução aquosa de cerca de 37% do formaldeído (gás), à qual se adiciona geralmente 10-15% de metanol para evitar a polimerização. Esta solução tem o mesmo poder que a

formalina a 40%. Esta formalina a 40% é considerada como a 100% e dela se fazem as várias soluções. Assim: formalina a 10% = 10 ml de formalina a 40% + 90 ml de água. A formalina se oxida em ácido fórmico e não deve ficar em contato com os cromatos por longo tempo. Para evitar o efeito do ácido fórmico, a formalina é tamponada com fosfato de sódio monobásico ou dibásico.

As reações da formalina com as proteínas tissulares são numerosas e complexas, porém se aceita que ela não precipita as proteínas e precipita ligeiramente os outros componentes celulares. A formalina não preserva nem destrói a gordura, é um bom fixador para os complexos lipídicos, porém não tem nenhum efeito sobre as gorduras neutras.

A formalina não é um fixador para os carboidratos.

Ácido acético glacial

O ácido acético glacial produz tumefação celular, e por isto nunca deve ser usado isolado, mas sim com reagentes que tenham poder de retração.

É de rápida penetração. Usa-se quando se querem estudar os detalhes nucleares (cromossomas). O ácido acético glacial precipita as nucleoproteínas e destrói as mitocondrias e o aparelho de Golgi. Não fixa lipídios nem carboidratos.

Deixa os tecidos moles e evita o endurecimento produzido pelos álcoois.

Álcool etílico

O álcool absoluto é usado para preservação do glicogênio. É de penetração lenta, endurece e retrai o tecido de acordo com a concentração usada. Precipita os ácidos nucleicos solúveis. Não forma composto com as proteínas, porém as desidrata. Precipita a albumina e a globulina, tornando-as insolúveis na água. Devido à retração citoplásmica que ocasiona, o álcool produz distorção celular. Dificulta a coloração nuclear, porém não interfere com a coloração citoplasmática. Os tecidos fixados em álcool não necessitam ser lavados para processamento posterior.

Cloreto de mercúrio

Raramente usado como fixador isolado devido à retração que ocasiona nos tecidos. Penetra rapidamente sem destruir os lipídios. Precipita todas as proteínas sem combinar-se com elas. Esses precipitados são solúvies em iodeto de potássio. É necessário remover esses precipitados antes da coloração. Facilita a coloração com a maioria dos corantes, realçando as cores. Não fixa nem destrói carboidratos.

Ácido pícrico

Raramente usado isoladamente como fixador, dada à retração celular que produz. Requer estocagem úmida devido ao seu poder explosivo. Tem boa penetração e é fixador rápido.

Precipita todas as proteínas, formando picratos que são hidrossolúveis. Deixa os tecidos moles e usado em combinação facilita a coloração.

Bicromato de potássio

Fixa o citoplasma sem ocasionar precipitação. Extremamente útil em combinação para fixação de lipides, especialmente fosfolipides. Usado para fixar mitocondrias. Requer abundante lavagem em água, para evitar no álcool a formação de um óxido que, uma vez formado, é irremovível.

Fixadores mais comuns

Solução de formalina comum (formol)

Formalina 37-40%	100,0 ml
Cloreto de sódio	9,0 gm
Água comum	900,0 ml

É um fixador muito comum, não causando excessivo endurecimento dos tecidos. Quando não tamponado, pode produzir pigmento de formol. Fixa a cromatina nuclear de maneira difusa e homogênea, não dando pois bom detalhe da cromatina. Não é recomendável para uso de rotina, porém ideal para a preservação de muco-substâncias.

Solução de formalina neutra, tampão, 10% (formol neutro)

Formalina 37-40%	100,0 ml
Água destilada	900,0 ml
Fosfato de sódio, monobásico	4,0 gm
Fosfato de sódio, dibásico (anidro)	6,5 gm

é o fixador de escolha e recomendado para uso de rotina.

Solução de formalina-acetato de sódio
(formol-acetato)

Formalina 37-40%.....	100,0 ml
Acetato de sódio.....	20,0 gm
Água comum.....	900,0 ml

É um bom fixador. Usado principalmente para guardar material em estoque.

Solução de formalina-brometo de amônio

Formalina 37-40%, neutralizada.....	15,0 ml
Brometo de amônio.....	2,0 gm
Água destilada.....	85,0 ml

Excelente fixador para cérebro, onde se usam técnicas argênticas e de ouro.

Solução de formalina-álcool-ácido acético
(formol-álcool-acético)

Formalina 37-40%.....	10,0 ml
Álcool, 80%.....	90,0 ml
Ácido acético glacial.....	5,0 ml

Não é um fixador ideal para guardar peças e de rotina. Serve, porém, para fixação rápida. Evita a hidrólise dos carboidratos antes que termine a fixação das proteínas. O ácido acético, fixando as nucleoproteínas, melhora a coloração nuclear. Fragmentos de 2 mm de espessura levam 4-6 horas a alcançar a fixação completa.

Solução de formol cálcico

Cloreto de cálcio, anidro.....	1,0 gm
Formalina 37-40%.....	10,0 ml
Água destilada.....	90,0 ml

Fixador indicado quando se quer estudar lipides.

Fixador de Zenker (solução estoque)

Água destilada.....	1000,0 ml
Cloreto de mercúrio.....	50,0 gm
Bicromato de potássio.....	25,0 gm
Sulfato de sódio.....	10,0 gm

Adicionar 5 ml de ácido acético glacial a 95 ml de Zenker no momento de usar. Após a fixação com Zenker aconselha-se colocar os tecidos por 2 horas em solução aquosa de bicromato de potássio a 2,5%.

Zenker-formol (solução de Helly)

Adicionar 5 ml de formalina (37-40%) a 95 ml de Zenker, no momento de usar. A formalina substitui o ácido acético glacial, na fórmula anterior. Bom fixador, é recomendado para demonstrar mitocondrias.

Fixador de Bouin

Ácido pícrico, solução aquosa saturada.....	750,0 ml
Formalina 37-40%.....	250,0 ml
Ácido acético glacial.....	50,0 ml

A fixação leva 4-12 horas, dependendo do tamanho da peça. Importante lavar em várias passagens de álcool a 50% por 4-6 horas para eliminar o ácido pícrico. Os tecidos assim tratados são conservados em álcool a 70%. A lavagem em álcool a 50% é essencial, pois o ácido pícrico residual irá interferir com a coloração, indefinidamente, uma vez feito o bloco, ou se o material fôr guardado em álcool a 70%, sem a prévia lavagem com o álcool a 50%.

Solução de Carnoy

Álcool absoluto.....	60,0 ml
Clorofórmio.....	30,0 ml
Ácido acético glacial.....	10,0 ml

É um dos fixadores mais rápidos e penetrantes. O tempo de fixação é em média de 3 horas. Não é necessário lavagem em água, e o tecido pode ser transferido diretamente ao álcool absoluto. Excelente fixador para: plasmacélulas, glicogênio, substância de Nissl e material nuclear. O único inconveniente é que hemoliza as hemácias.

MÉTODOS PARA REMOÇÃO DE PIGMENTOS E PRECIPITADOS

1. Precipitados de mercúrio

Devido principalmente a fixadores que contêm cloreto de mercúrio. São chamados cristais de Zenker.

Método:
1. Desparafinar e hidratar as lâminas, levando-as à água
2. Colocar numa das seguintes soluções por 15 minutos:

Solução de Iodo de Gram

Iodo	1,0 gm
Iodeto de potássio	2,0 gm
Água destilada	300,0 ml

Solução de Iugol

Iodo	1,0 gm
Iodeto de potássio	2,0 gm
Água destilada	100,0 ml

3. Mergulhar em água comum
4. Colocar em solução aquosa de tiossulfato (hipo) a 5% por 3 minutos
5. Lavar em água pura por 10 minutos ou mais. Seguir o método de coloração escolhido.

2. Pigmentos de melanina

O permanganato de potássio é o reagente de escolha para eliminar os pigmentos de melanina ou os que assim se chamam. O tratamento com permanganato de potássio dificulta, no entanto, a coloração posterior. Daí tratarem-se as lâminas ou cortes, previamente, com celoidina ou gelatina-formol.

Método de celoidina, para proteger os cortes:
1. Desparafinar e levar as lâminas até o álcool absoluto
2. Colocar os cortes em solução de celoidina a 0,5-1% por 1-2 minutos
3. Secar as lâminas ao ar por 30 minutos ou até que fiquem brancas
4. Colocar as lâminas em álcool a 80% por 1-2 minutos
5. Mergulhar em água destilada e prosseguir com a coloração escolhida.

Não usar este método para as seguintes colorações: fucsina aldeídica, azul alciano, técnicas de mucopolissarides, mucicarmin, Schiff ou Gridley.

Método da gelatina-formol, para proteger os cortes:

1. Pescar os cortes em lâmina tratada com albumina ou gelatina
2. Deixar as lâminas com os cortes escorrerem por meio minuto
3. Colocar as lâminas num jarro de Coplin com 5 ml de formalina a 37-40%. Não deixar os cortes em contato com o formol Cobrir o jarro de Coplin, levar à estufa a 60 graus por 1 hora
4. Retirar as lâminas da estufa e deixar secar por algumas horas na estufa ou na temperatura ambiente durante a noite
5. Seguir o método de coloração escolhido

Método para remover pigmento de melanina:

1. Cortes em parafina ou em congelação
2. Não pescar os cortes em lâmina, porém transferi-los a uma solução aquosa de permanganato de potássio a 0,25%, por uma hora, mexendo a solução frequentemente. A despigmentação pode ser acelerada se a solução estiver a 37 graus
3. Transferir os cortes para água distilada
4. Passar para uma solução aquosa de ácido oxálico ou hidrobrômico a 5%, até a descoloração dos cortes
5. Água destilada, 3 passagens, 10 minutos cada
6. Pescar os cortes em lâmina com albumina e deixar secar na estufa a 60 graus (1 hora) ou à temperatura ambiente até o dia seguinte
7. Desparafinar, hidratar e corar pelo método escolhido

3. Pigmentos de formalina e de malária

Os tempos registrados nos métodos que se descrevem a seguir são apenas indicativos, pois dependem do tempo de estocagem do material em formol. A lavagem das lâminas após a despigmentação deve durar 16 horas. Os pigmentos de formol se removem mais facilmente que o pigmento malárico.

Método para remoção do pigmento de formol ou malárico:

1. Desparafinar e hidratar as lâminas em água
2. Mergulhar várias vezes em água destilada
3. Colocar por 1 hora na solução:
   Álcool 95%..... 50,0 ml
   Hidróxido de amônio (sol. aquosa a 28%)... 15,0 ml
4. Lavar bem em água corrente e corar pelo método escolhido.

Coloração pela hematoxilina e eosina

Noções gerais

A hematoxilina é um corante natural que tem pouca afinidade tissular quando usado isoladamente. Combinada com sáis de alumínio, ferro, cobre, crômio ou tungstênio, adquire grande afinidade tintorial nuclear. Através de diferenciação apropriada, a hematoxilina mostra suas propriedades policromáticas. O princípio ativo da hematoxilina é a hemateína, resultante da oxidação da primeira.

A oxidação da hematoxilina se obtém através da "maturação" da hematoxilina, a qual pode ser obtida naturalmente (dias ou semanas) ou acelerada pela adição de agentes oxidantes, tais como: óxido de mercúrio água oxigenada, permanganato de potássio, perborato de sódio ou iodato de sódio. Estes oxidantes iniciam o processo de maturação, o qual continua com o tempo. Deve-se usar a quantidade de oxidante prescrita para cada tipo de hematoxilina a fim de manter as suas propriedades corantes. Quando exposta à luz natural, o processo de maturação é acelerado, daí recomendar-se guardar as soluções em frascos escuros e bem fechados. Pela mesma razão, trocar, semanalmente a solução corante, a fim de manter padrão de coloração adequado e constante.

Os tipos de hematoxilina mais usados contêm alumínio sob a forma de alúmen. Em tal categoria se incluem as hematoxilinas de Harris, Delafield, Erlich, Mayer, Bullar e Bohmer. A coloração de fundo é feita com eosina, safranina, floxina ou outros corantes. As hematoxilinas férricas ou túngsticaas tem afinidade particular para mielina e para tricrômicos e algumas outras colorações especiais. Neste grupo se incluem as hematoxilinas de Weigert, fosfotúngstica de Mallory (PTAH).

O método de "rotina" de coloração com a hematoxilina-eosina (HE) produz excelentes resultados, desde que se observem rigorosamente as regras de fixação, idade do corante, etc.

Há dois métodos de coloração com a Hematoxilina e eosina: (1) método progressivo: usando hematoxilina com excesso de sáis de alumínio ou ácido, aumentando pois a seletividade cromática nuclear. Após lavagem em água, permite coloração secundária. (2) método regressivo: os cortes são supercorados em solução de hematoxilina neutra. O excesso é removido com solução de álcool-ácido (diferenciação), controlando-se os cortes ao microscópio. Os cortes são depois neutralizados com solução fraca de água amoniacal ou carbonato de lítio. Um corte bem diferenciado deve mostrar citoplasma incolor, e o núcleo deve estar bem corado e mostrando metacromasia nuclear.

Há vários métodos para fazer a coloração de fundo, que serve para ressaltar mais um dos corantes. No caso da HE isto não é verdade, pois a eosina serve para demonstrar inclusões e alterações citoplasmáticas. Os erros mais comuns com o uso da eosina se devem ao emprego inadequado dos álcoois, após o uso deste corante. O álcool tem uma dupla função: desidratar e remover excesso de corante. Uma passagem rápida pelo álcool causa uma difusão do corante, obscurecendo pigmentos e inclusões. A diferenciação alcoólica da eosina é pois uma etapa essencial no processo de coloração.

Ao se preparar hematoxilina, sigam-se à risca as instruções, e assegure-se que os sáis usados (sulfato de amônio e alumínio e o sulfato de alúmen e potássio) estão completamente dissolvidos. Só se adicione hematoxilina quando os sáis estejam em completa solução.

TIPOS DE HEMATOXILINA

Hematoxilina de Mayer (solução estoque)

Hematoxilina (cristais)	1,0 gm
Água destilada	1000,0 ml
Iodato de sódio	0,2 gm
Alúmen de amônio ou potássio	50,0 gm
Ácido cítrico	1,0 gm
Hidrato de cloral	50,0 gm

Há dois métodos de preparar a hematoxilina:

1º método: dissolver o alúmen em água, a frio, juntar hematoxilina, adicionar o iodato de sódio, o ácido cítrico e o cloral, agitando-os continuamente até solução completa. A cor final deve ser vermelho-violeta. A solução se mantem por meses. Identificar o vidro, incluindo a data.

2º método: dissolver o alúmen em 500 ml de água, a quente (não ferver). Dissolver o cloral, ácido cítrico e o iodato de sódio nos outros 500 ml de água. Dissolver a hematoxilina em 10 ml de álcool absoluto. Misturar as 3 soluções. Guardar em vidro apropriado identificando a solução, inclusive a data de fabricação da hematoxilina.

Hematoxilina de Harris (solução estoque)

Hematoxilina (cristais)	5,0 gm
Álcool, 100%	50,0 ml
Alúmen de potássio ou amônio	100,0 gm
Água destilada	1000,0 ml
Oxido de mercúrio (vermelho)	2,5 gm

Método de preparação: dissolver a hematoxilina no álcool. Dissolver o alúmen na água, aquecendo (não ferver). Retirar do fogo e misturar as duas soluções. Levar à ebulição, rapidamente (agitando constantemente com bastão de vidro). O tempo para ebulição não deve ultrapassar

um minuto. Retirar do fogo e adicionar lentamente o óxido de mercúrio. Colocar a mistura no fogo lento, até a solução adquirir cor púrpura escura. Retirar do fogo e colocar imediatamente em banho de água fria. Juntar 2-4 ml de ácido acético glacial por 100 ml de solução, para melhorar a coloração nuclear. Filtrar antes de usar. Guardar a solução estoque já amadurecida ao abrigo da luz.

Hematoxilina férrica de Weigert (sol. estoque)

Solução A

Hematoxilina (cristais).....	1,0 gm
Álcool 95%.....	100,0 ml

Solução B

Cloreto férrico, sol. aquosa a 29%.....	4,0 ml
Água destilada.....	95,0 ml
Ácido clorídrico, concentrado.....	1,0 ml

Misturar partes iguais de A e B no momento de usar. Esta hematoxilina não se recomenda para rotina. Excelente coloração nuclear para técnicas especiais.

Nota: Para outros tipos de hematoxilina (mais de 60 tipos), consultar: Gray, P.: The Microtomist's Formulary and Guide, New York, McGraw Hill Book Co., 1954.

COLORAÇÃO DE CONTRASTE

Solução alcoólica de eosina a 1% (solução estoque)

Eosina Y, hidrossolúvel	1,0 gm
Água destilada	20,0 ml

Após a dissolução, adicionar:

Álcool, 95%	80,0 ml

Solução alcoólica de eosina a 1% (solução de uso)

Eosina (solução estoque)	1 parte
Álcool 80%	3 partes

No momento de usar, adicionar 0,5 ml de ácido acético glacial por 100 ml da solução.

Solução de eosina-floxina

Eosina (solução estoque)

Eosina Y, hidrossolúvel	1,0 gm
Água destilada	100,0 ml

Floxina (solução estoque)

Floxina B	1,0 gm
Água destilada	100,0 ml

Solução de uso

Eosina (solução estoque)	100,0 ml
Floxina (solução estoque)	10,0 ml
Álcool, 95%	780,0 ml
Ácido acético glacial	4,0 ml

Preparar a solução de uso de acordo com as necessidades. A solução deve ser trocada cada semana.

Método de coloração de rotina, Hematoxilina & Eosina

Preferimos a hematoxilina de Mayer, por não requerer a diferenciação e dar um fundo incolor. Lavando os cortes em água corrente, por 20 minutos ou mais, a coloração se mantém estável para sempre. Se a lavagem não fôr bem feita, a coloração dos cortes vai enfraquecendo depois de alguns anos.

A outra vantagem deste método é que as lâminas podem ficar na hematoxilina de Mayer por horas sem perigo de supercoloração.

Fixação: qualquer fixador

Técnica: cortes em parafina, celoidina ou em congelação

Método de coloração:

1. Desparafinar e hidratar levando as lâminas até água destilada
2. Se o tecido foi fixado em Zenker, passar por solução de iodo ou lugol e depois passar pela solução de tiossulfato a 5% por 3 minutos (ver página 6 para maiores detalhes).
3. Hematoxilina de Mayer por 15 minutos
4. Lavar em água corrente por 20 minutos
5. Coloração com eosina (15 segundos a 2 minutos), dependendo da idade da solução e intensidade de cor desejada. Para coloração rotineira, mergulhar as lâminas várias vézes na eosina e depois deixar na solução pelo tempo desejado
6. Desidratar em dois álcoois a 95%, dois álcoois absolutos, até remover excesso de eosina. Controlar ao microscópio
7. Passagem em dois xilóis, 2 minutos cada
8. Montagem em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

núcleos - azul com alguma metacromasia

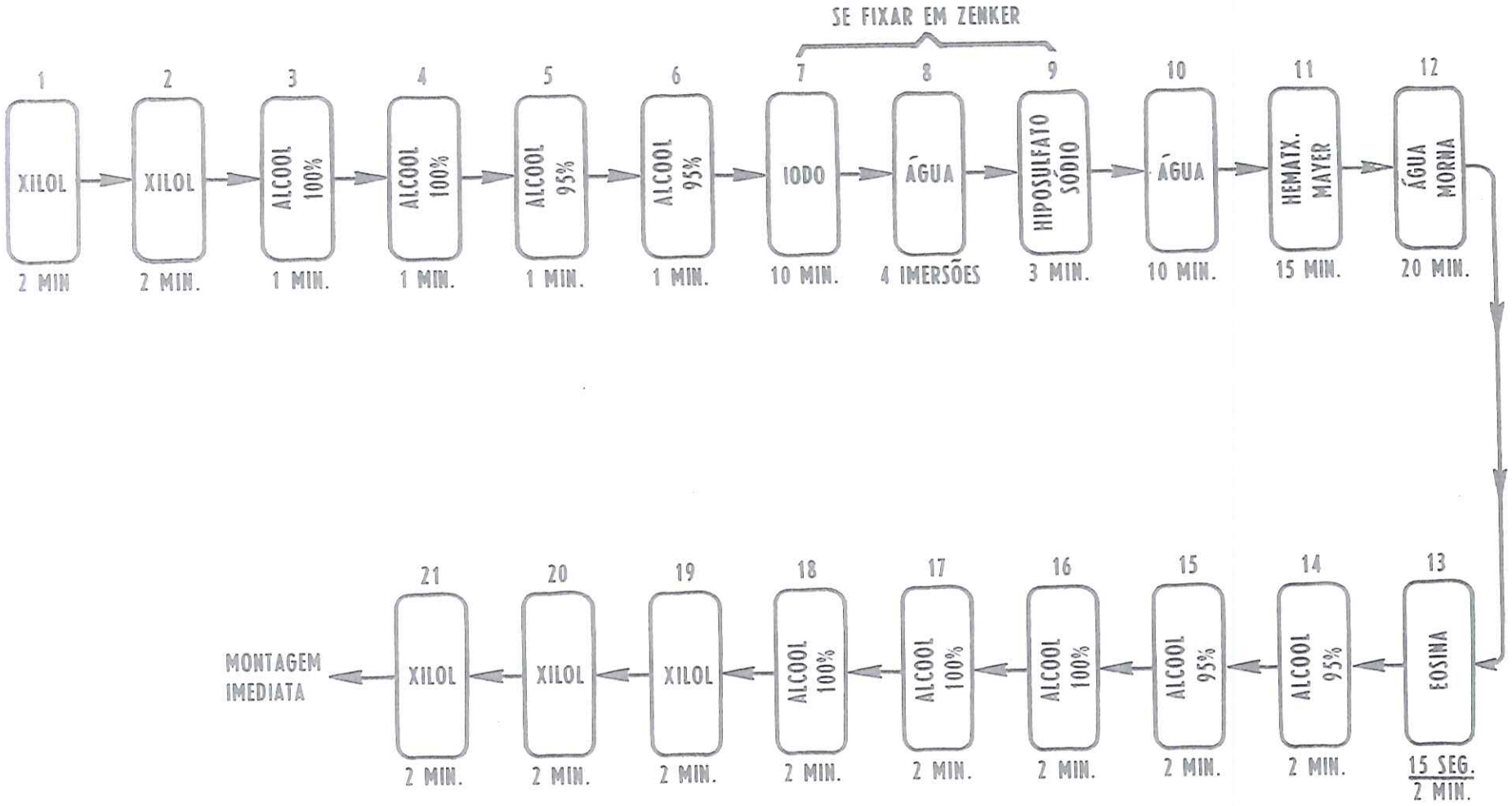
citoplasma - várias tonalidades de rosa

Observação: Algumas vezes, a hematoxilina de Mayer cora a albumina ou gelatina, usada para colar os cortes na lâmina, depositando excesso de corante. Este excesso de corante se elimina passando-se as lâminas diretamente da hematoxilina para uma solução alcoólica (10-12%) de ácido acético glacial em álcool a 95%. A seguir mergulhe-se algumas vezes em solução saturada de carbonato de lítio. Esta última viragem é facultativa, pois a lavagem em água corrente por 20 minutos também vira a coloração nuclear para o azul. A técnica que acaba de ser descrita não altera de forma alguma a coloração nuclear.

Referência: Histopathology Laboratories, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C. 20305

O esquema anexo indica a sequência do método de coloração H&E, com hematoxilina de Mayer.

COLORAÇÃO DE ROTINA HEMATOXILINA-EOSINA.



MÉTODO DE MAY-GRÜNWALD GIEMSA

Fixação: Zenker ou outra fixação bem feita

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de Jenner (estoque)*

Corante de Jenner (em pó, seco)..... 1,0 gm

Álcool metílico..... 400,0 ml

Solução de Jenner (para uso)

Solução de Jenner (estoque)..... 25,0 ml

Água destilada..... 25,0 ml

Solução de Giemsa (estoque)**

Giemsa (em pó)..... 1,0 gm

Glicerina..... 66,0 ml

Álcool metílico..... 66,0 ml

Misturar a glicerina e o Giemsa em pó. Colocar em estufa a 60 graus por duas horas. Juntar finalmente 66 ml de álcool metílico.

Solução de Giemsa (para uso)

Solução de Giemsa (estoque)..... 50 gotas

Água destilada..... 50,0 ml

Sempre fazer solução fresca no momento de usar. Não reusar.

Solução aquosa de ácido acético glacial a 1%

Ácido acético glacial..... 1,0 ml

Água destilada..... 100,0 ml

---

* Jenner - National Aniline Certified & usar somente National

** Aniline Certified Giemsa

Solução iodada de Gram

Iodo	1,0 gm
Iodeto de potássio	2,0 gm
Água destilada	300,0 ml

Solução de Lugol

Iodo	1,0 gm
Iodeto de potássio	2,0 gm
Água destilada	100,0 ml

Método de coloração:

1. Desparafinar, desidratar e levar os cortes até água destilada
2. Remover os cristais de cloreto de mercúrio com solução iodada de Gram ou Lugol e clarear com solução aquosa a 5% de tiossulfato de sódio (hipo) por 3 minutos
3. Lavar em água corrente por 10 minutos ou mais
4. Mergulhar em duas águas destiladas
5. Duas mudanças em álcool metílico, 3 minutos cada
6. Solução de Jenner (uso), por 6 minutos
7. Solução de Giemsa (uso), por 45 minutos
8. Agora tratar cada lâmina individualmente até a montagem
   - 8.1 Diferenciar em solução aquosa de ácido acético glacial a 1%; controlar a diferenciação nuclear ao microscópio
   - 8.2 Mergulhar em água destilada
   - 8.3 Passagem por dois álcoois a 95%, dois álcoois absolutos, dois xilóis
   - 8.4 Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

núcleos	- azul
citoplasma	- rosa claro a rosa escuro
bactéria	- azul

Referência: Strumia, M.M.: J. Lab. Clin. Med. 21:930-934, 1935-1936

MÉTODO TRICRÔMICO DE GOMORI
(para tecido conjuntivo)

Fixação: solução de formalina neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes de parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de Bouin

Ácido pícrico, solução aquosa saturada.....	750,0 ml
Formalina, solução concentrada (37-40%).....	250,0 ml
Ácido acético glacial.....	50,0 ml

Solução tricrômica

Cromotropo 2R.....	0,6 gm
Verde luz, SF, amarelo.....	0,3 gm
Ácido acético glacial.....	1,0 ml
Ácido fosfotúngstico.....	0,8 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Substituir o verde luz por azul de anilina se se deseja corar o colageno em azul.

Método de coloração:

1. Desparafinar, hidratar e levar as lâminas até água destilada
2. Colocar em solução de Bouin, na estufa a 56 graus por uma hora
3. Lavar bem em água corrente ou até desaparecer a cor amarela dos cortes
4. Corar os núcleos com hematoxilina férrica de Weigert ou solução de hematoxilina crômica de Gomori. Corar por 10 minutos
5. Lavar em água corrente
6. Corar pelo tricrômico de 15 a 20 minutos
7. Colocar as lâminas em água acética a 0,5% por dois minutos. Se os cortes estiverem muito escuros, diferenciar em água acética a 1%, com a adição prévia de 0,7 gm de ácido fosfotúngstico
8. Mergulhar em água destilada
9. Desidratar em dois álcoois, a 95%, dois álcoois absolutos e depois passar por dois xilóis

10. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

fibras musculares	-	vermelho
colágeno	-	verde (ou azul, se usar azul de anilina)
núcleos	-	azul a negro

Referências: Gomori, G.: Amer. J. Clin. Path. 20:661-664, 1950.
Copyright by Williams & Wilkins Co.

MÉTODO DE MAY-GRÜNWALD GIEMSA - MODIFICADO

Fixação: Zenker ou solução de formalina, neutra, tampão a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de Azur II - Eósina

Em um frasco escuro de 1000 ml, colocar algumas contas de vidro esterilizadas.

Azur II - Eosina *..... 1,3 gm

Glicerina..... 80,0 ml

Deixar a mistura em estufa (56-60 graus), por duas horas. Deixar esfriar.

Juntar:

Metanol..... 170,0 ml

Acetona..... 170,0 ml

Solução de May-Grünwald

Em um Erlemeyer de 1000 ml, misturar:

May-Grunwald (corante)*..... 0,15 gm

Metanol..... 290,0 ml

Acetona..... 290,0 ml

Solução de Giemsa (estoque)

Misturar as soluções de Azur II-eosina e May-Grünwald. A solução pode ser usada imediatamente, porém o corante melhora com o tempo.

Solução de água acética

Acido acético glacial..... 0,01 ml

Água destilada.....1000,0 ml

---

* Azur II - eosina (Giemsa) e corante de May-Grünwald: Harleco, 60th & Woodland Avenue, Philadelphia, Pennsylvania - 19143

Método de coloração:

1. Desparafinar, hidratar e levar os cortes até água destilada
2. Se o tecido fôr fixado em Zenker, remover os cristais de cloreto de mercúrio com iodo e tiossulfato (hipo) de sódio, da maneira habitual
3. Solução de Giemsa (sol. de uso) por uma hora
4. Desidratar em 3 álcoois absolutos
5. Passar por 3 xilóis
6. Montagem em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados

núcleos	- azul
hemácias	- vermelho
grânulos de mastocitos	- púrpura
citoplasma	- rosa

Referência: Histopathology Laboratories, A.F.I.P. - modificação por Elbert Gaffney

MÉTODO DE VAN GIESON
(para fibras colagenas)

Fixação: qualquer tecido bem fixado

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de Hematoxilina férrica de Weigert

Solução A

Cristais de hematoxilina.....	1,0 gm
Álcool 95%.....	100,0 ml

Solução B

Cloreto férrico (percloreto), solução aquosa a 29%.	4,0 ml
Água destilada.....	95,0 ml
Ácido clorídrico, concentrado.....	1,0 ml

Solução para uso: misturar partes iguais de solução A e B no momento de usar.

Solução de Van Gieson

Fucsina ácida, solução aquosa a 1%.....	2,5 ml
Ácido pícrico, solução aquosa saturada.....	97,5 ml

A solução aquosa saturada de ácido pícrico é feita adicionando-se 2 gm de ácido a aproximadamente 100 ml de água destilada em ebulição. Deixar repousar a solução por 24 horas.

Método de coloração:

1. Desparafinar e levar os cortes até água destilada
2. Hematoxilina de Weigert, por 10 minutos
3. Lavar em água destilada
4. Van Gieson, 1-3 minutos

5. Desidratar em dois álcoois 95%, dois álcoois absolutos, dois xilóis

6. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

colágeno	- vermelho
músculo e epitélio corneificado	- amarelo
núcleos	- azul a negro

Referência: Mallory, F.B.: Pathological Technique, New York, Hafner Publishing Co. page 152

MÉTODO DE HART
(para fibras elásticas)

Fixação: solução tampão, formalina neutra a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de permanganato de potássio a 0,25%

Permanganato de potássio	0,25 gm
Água destilada	100,0 ml

Solução de ácido oxálico a 5%

Ácido oxálico	5,0 gm
Água destilada	100,0 ml

Solução de fucsina-resorcina (sol. estoque)

Fucsina básica	2,0 gm
Resorcina	4,0 gm
Água destilada	200,0 ml

Colocar os reativos numa cápsula de porcelana. Aquecer e quando em ebulição adicionar 25 ml de uma solução de percloreto de ferro (cloreto férrico) a 29%. Agitar constantemente com um bastão de vidro. Deixar esfriar e filtrar. O líquido filtrado não se aproveita. Deixar secar o precipitado que fica no papel de filtro. Colocar o papel de filtro com o precipitado na cápsula de porcelana, que também contém resíduos de precipitado aderente às paredes. Adicionar 200 ml de álcool 95%, aquecer em fogo brando, agitando-se constantemente. Tirar pouco a pouco o papel de filtro, que se liberta do precipitado. Deixar esfriar e juntar 4 ml de ácido clorídrico. A solução serve para vários meses.

Solução de fucsina-resorcina (sol. de uso)

Fucsina-resorcina (solução estoque)	10,0 ml
Álcool, 70%	100,0 ml
Ácido clorídrico, concentrado	2,0 ml

Solução de Van Gieson

Fucsina ácida, solução aquosa a 1%..... 2,5 ml

Ácido pícrico, solução aquosa saturada..... 97,5 ml

Método de coloração:

1. Desparafinar e levar os cortes até água destilada
2. Solução de permanganato de potássio por 5 minutos
3. Mergulhar em água destilada
4. Solução de ácido oxálico até os cortes ficarem claros
5. Lavar em água corrente por 5 minutos e depois colocar em água destilada
6. Fucsina-resorcina (solução de uso), deixar corando de um dia para outro
7. Lavar em água corrente por 10 minutos
8. Mergulhar em água destilada
9. Solução de Van Gieson por um minuto
10. Desidratar em 2 álcoois 95%, dois álcoois absolutos, e passar por dois xilóis
11. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

fibras elásticas	- de azul negro a negro
núcleos	- de azul a negro
colágeno	- de rosado a vermelho
outros tecidos	- amarelo

Observação: Este método é especialmente recomendado para demonstrar fibras elásticas finas e fibras elásticas degeneradas (elacina).

Referência: Mallory, F.B.: Pathological Technique, New York, Hafner Publishing Co., 1961, p.169. AFIP modification

MÉTODO DE GOMORI
(para reticulina)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de prata amoniacal

Nitrato de prata, sol. aquosa a 10%..... 10,0 ml

Hidróxido de potássio, sol. aquosa a 10%..... 2,5 ml

Adicionar gota a gota, sol. aquosa de hidróxido de amônio a 28%, agitando o frasco continuamente até dissolução completa do precipitado. Juntar, outra vez, cuidadosamente, gotas de nitrato de prata (10%), até que o precipitado que se forma desaparece facilmente com a agitação. Completar com o dobro do volume em água distilada. Guardar a solução em vidro químicamente limpo.

Solução de permanganato de potássio a 0,5%

Permanganato de potássio..... 0,5 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de metabisulfito de potássio, a 2%

Metabisulfito de potássio..... 2,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de sulfato férrico-amoniacal a 2%

Sulfato férrico-amoniacal..... 2,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de formalina a 20%

Formaldeído (37-40%)..... 20,0 ml

Água destilada..... 80,0 ml

Solução de cloreto de ouro a 0,2%

Solução de cloreto de ouro a 1%..... 10,0 ml

Água destilada..... 40,0 ml

Nota: para fazer a solução de cloreto de ouro a 1%: Quebre a ampola de cloreto de ouro (15 grains) em um beker com 100 ml de água destilada.

Solução de tiossulfato de sódio a 2%

Tiossulfato de sódio..... 2,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Método de coloração:

1. Desparafinar, hidratar e levar as lâminas até água destilada
2. Oxidar em permanganato de potássio a 0,5% por um minuto
3. Lavar em água corrente em dois minutos
4. Diferenciar com solução de metabissulfito a 2%, por 1 minuto
5. Lavar em água comum por 2 minutos
6. Passar na solução de sulfato férrico-amoniacal por 1 minuto
7. Lavar em água comum por 2 minutos. Depois por duas passagens de água destilada, 30 segundos cada
8. Impregnar na solução de prata amoniacal por 1 minuto
9. Mergulhar em água destilada por 20 segundos
10. Reduzir na solução de formaldeído por 3 minutos
11. Lavar em água comum por 3 minutos
12. Matizar em cloreto de ouro a 0,2%, por 10 minutos
13. Mergulhar em água destilada
14. Reduzir na solução de metabissulfito de potássio por 1 minuto
15. Fixar em solução de tiossulfato de sódio a 2%, por 1 minuto
16. Lavar em água pura por 2 minutos
17. Desidratar em dois álcoois 95%, dois álcoois absolutos, duas passagens por xilol
18. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

fibras de reticulina - negro
coloração de fundo - cinza

Observação: Esta técnica é muito boa para demonstrar reticulina no sistema nervoso central.

Referência: Gomori, G.: Amer. J. Path. 13:993-1002, 1937

MÉTODO DE WILDER
(para reticulina)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Ácido fosfomolíbdico, a 10%

Ácido fosfomolíbdico.....	10,0 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Nitrato de urânio, a 1%

Nitrato de urânio.....	1,0 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Solução de prata amoniacal

Usar vidraria quimicamente limpa.
Num frasco de 50,0 ml, pipetar 5,0 ml de solução aquosa de nitrato de Prata a 10,0%; adicionar, gota a gota, solução aquosa de hidróxido de amônio, até dissolver o precipitado. Pipetar 5,0 ml de solução aquosa de hidróxido de sódio a 3,1% na solução acima e dissolver o precipitado resultante com algumas gotas de hidróxido de amônio. Completar o volume até 50,0 ml com água destilada.

Solução redutora

Água destilada.....	50,0 ml
Formalina neutra(*).....	0,5 ml
Nitrato de urânio, a 1%.....	1,5 ml

(*) com excesso de carbonato de cálcio. Fazer a solução redutora na hora de usar.

Solução de cloreto de ouro a 0,2%

Cloreto de ouro, solução a 1%.....	10,0 ml
Água destilada.....	40,0 ml

Nota: Para fazer a solução de cloreto de ouro a 1%: quebre a ampola de cloreto de ouro (15 grains) em um beker com 100 ml de água destilada.

Solução de tiossulfato (hipo) de sódio a 5%

Tiossulfato de sódio..... 5,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de vermelho rápido nuclear (kernechtrot)

Dissolver 0,1 gm de vermelho rápido em 100 ml de uma solução aquosa de sulfato de alumínio. Aquecer para facilitar a dissolução. Esfriar, filtrar e juntar grão de timol como preservativo.

Método de coloração:

1. Desparafinar, hidratar e levar as lâminas até água destilada
2. Oxidar em ácido fosfomolíbdico, por um minuto
3. Lavar bem em água corrente para que as células não fiquem amarelas
4. Passar em nitrato de urânio a 1%, por um minuto
5. Mergulhar em água destilada, 10 a 20 segundos
6. Solução de prata amoniacal, por um minuto. Se forem muitas as lâminas, trocar frequentemente a solução
7. Mergulhar rapidamente em álcool a 95% e imediatamente passar a:
8. Solução redutora (mudar a solução frequentemente) por um minuto
9. Lavar bem em água destilada
10. Matizar em cloreto de ouro por um minuto ou até que os cortes percam sua tonalidade amarelada e se tornem de cor púrpura leve. Um matizado exagerado torna os cortes vermelhos. Controlar cada lâmina ao microscópio
11. Mergulhar em água destilada
12. Solução de tiossulfato de sódio por um minuto
13. Lavar bem em água comum
14. Coloração de fundo, se desejar, com vermelho rápido. Lavar bem em água destilada
15. Desidratar em dois álcoois 95%, dois álcoois absolutos. Duas passagens por xilol
16. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

fibras de reticulina	-	negro
colageno	-	rosa
outros elementos tissulares	-	vermelho

Observação: As fibras de reticulina devem aparecer com limites bem nítidos, em fundo relativamente claro. Se o fundo estiver escuro e as fibras pouco nítidas, deve-se trocar tanto a solução redutora como a prata amoniacal.

Referência: Wilder, H.C.: Amer. J. Path. 11:817-821, 1935

METODO DO ÁCIDO FOSFOTÚNGSTICO (PTAH)
(para sistema nervoso central e musculatura)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Permanganato de potássio a 1% (solução estoque)

Permanganato de potássio.....	1,0 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Ácido oxálico a 5%

Ácido oxálico.....	5,0 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Solução de ácido fosfotúngstico (PTAH)

Hematoxilina.....	1,0 gm
Ácido fosfotúngstico.....	20,0 gm
Água destilada.....	1000,0 ml

Dissolver a hematoxilina com água quente. Dissolver o ácido fosfotúngstico no restante de água. Misturar as duas soluções. Guardar ao abrigo da luz. Não é necessário adicionar preservativo. A solução demora algumas semanas para amadurecer, porém a adição de 0,2 gm de permanganato de potássio permite usar a solução imediatamente.

Solução de Zenker

Água destilada.....	1000,0 ml
Cloreto de mercúrio.....	50,0 gm
Bicromato de potássio.....	25,0 gm
Sulfato de sódio.....	10,0 gm

No momento de usar, juntar 5 ml de ácido acético glacial a 95 ml de Zenker. A solução não dura muito após a adição do ácido acético. Após a fixação com Zenker, aconselha-se colocar o tecido em solução aquosa a 2,5% de bicromato de potássio por duas horas. Lavar depois por 12 horas em água corrente. O material fixado em Zenker requer maior tempo na hematoxilina.

Solução de lugol

Iodo..... 1,0 gm

Iodeto de potássio..... 2,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Método de coloração:

1. Desparafinar e hidratar levando as lâminas até água destilada
2. Colocar as lâminas em Zenker com ácido acético glacial (até o dia seguinte) ou por uma hora a 60 graus
3. Lavar em água corrente por 15 minutos
4. Solução de lugol por 15 minutos
5. Descorar em álcool 95% por uma hora ou mais. Não usar tiossulfato de sódio para descorar por interferir com a coloração subsequente
6. Água destilada por 5 minutos
7. Oxidar em permanganato de potássio por 5 minutos
8. Descorar em ácido oxálico por 5 minutos
9. Mergulhar várias vezes em água destilada e depois passar em água corrente por 5-10 minutos
10. Solução de PTAH por 24 horas
11. Álcool 95%, rápida passagem (uma só vez)
12. Desidratar em dois álcoois absolutos (passagem rápida)
13. Xilol, duas passagens
14. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

núcleos, fibrina e microglia - azul
fibras elásticas grossas - púrpura

Referência: Histopathology Laboratories, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., 20305

MÉTODO DE KLÜVER-BARRERA
(para mielina e células nervosas)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 15 micra

Soluções:

Solução de Azul rápido Luxol a 0,1%

Azul rápido luxol, MBS (*)..... 0,1 gm

Álcool, 95%..... 100,0 ml

Dissolver o corante em álcool. Adicionar 0,5 ml de ácido acético glacial a 10% por cada 100 ml. A solução é estável.

Solução violeta de cresil ECHT, a 0,1%

Violeta de cresil ECHT..... 0,1 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Adicionar 15 gotas de ácido acético glacial no momento de usar. Filtrar.

Solução de carbonato de lítio 0,05%

Carbonato de lítio..... 0,05 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de álcool 70%

Álcool, 100%..... 70,0 ml

Água destilada..... 30,0 ml

Método de coloração:

1. Desparafinar e hidratar até álcool 95%
2. Solução de azul rápido luxol, em estufa 56-60 graus. Deixar de um dia a outro
3. Mergulhar em álcool 95% para remover excesso de corante
4. Mergulhar em água destilada
5. Começar a diferenciação, mergulhando rapidamente em solução de carbonato de lítio
6. Continuar a diferenciação em álcool 70% até que haja distinção entre substância branca e cinzenta

(*) E.I. Du Pont de Nemours and Co., Wilmington, Del.

7. Lavar em água destilada

8. Terminar a diferenciação, passando rapidamente por carbonato de lítio e depois por vários álcoois 70% até obter um bom contraste entre substância branca (corada em azul esverdeada) e a substância cinzenta (incolor)

9. Mergulhar várias vezes em água destilada

10. Violeta de cresil ECHT por 6 minutos. Filtrar e aquecer a solução a 57 graus antes de usar

11. Diferenciar em várias passagens por álcool 95%

12. Desidratar em 2 álcoois absolutos, duas passagens em xilol

13. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

mielina - azul
produtos celulares - rosa a violeta

Referência: Klüver, H., e Barrera, E.: J. Neuropath. Exp. Neurol. 12:400-403, 1953

METODO DE BODIAN
(para fibras nervosas e terminações nervosas)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de protargol a 1%

Protargol..... 1,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Espargir o protargol na superfície da água e deixar dissolver sem agitar

Solução redutora

Hidroquinona..... 1,0 gm

Formalina, 37-40%..... 5,0 ml

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de cloreto de ouro a 1%

Cloreto de ouro..... 1,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de ácido oxálico a 2%

Ácido oxálico..... 2,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de tiossulfato (hipo) de sódio a 5%

Tiossulfato de sódio..... 5,0 mg

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de anilina azul

Anilina azul..... 0,1 gm

Ácido oxálico..... 2,0 gm

Ácido fosfomolíbdico..... 2,0 gm

Água destilada..... 300,0 ml

Solução vermelho rápido lisamina

Vermelho rápido lisamina..... 1,0 gm

Ácido glacial acético..... 1,0 ml

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de tartrazina

Tartrazina..... 1,5 gm

Ácido acético glacial..... 1,5 ml

Água destilada.....100,0 ml

Método de coloração:

1. Desparafinar, hidratar e levar as lâminas até água destilada
2. Colocar 5 gm de cobre (metálico), limpo num jarro de coplin. Adicionar 100 ml de solução de protargol. Deixar por 48 horas à temperatura 37 graus centígrados
3. Mergulhar em água destilada, 3 passagens
4. Solução redutora por 10 minutos
5. Mergulhar em água destilada, 3 passagens
6. Matizar em cloreto de ouro, por 10 minutos
7. Mergulhar em água destilada, 3 passagens
8. Passar em solução de ácido oxálico por 3-5 minutos. Controlar ao microscópio até a coloração de fundo ficar cinza e as fibras nervosas visíveis
9. Mergulhar em água destilada, 3 passagens

10. Tiossulfato de sódio por 5 minutos

11. Mergulhar em água destilada

12. Coloração de fundo com azul de anilina (2-3 imersões rápidas)

13. Desidratar em 2 álcoois 95%, dois álcoois absolutos, duas passagens em xilol

14. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

(usando azul de anilina)
fibras nervosas - negro
coloração de fundo - azul
núcleos - negro

Observação: Pode-se usar fio de cobre em vez de grânulos de cobre. Pode-se reusar o cobre, desde que tratado com 3 banhos de ácido nítrico e depois lavado com água destilada.

Referência: LUNA, L. G. Amer. J. Med. Techn. 30:355-362, 1964 (AFIP modification)

METODO DE VOGT
(para a substância de Nissl)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de violeta de cresil, ECHT (sol. estoque)

Violeta de cresil, ECHT (estoque)..... 2,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Solução tampão

Acetato de sódio..... 2,0 gm

Água destilada.....1000,0 ml

Ácido acético glacial..... 3,0 ml

Violeta de cresil ECHT (solução de uso)

Violeta de cresil (solução estoque)..... 1,0 ml

Solução tampão..... 100,0 ml

Método de coloração:

1. Desparafinar e passar por dois álcoois absolutos
2. Deixar em álcool absoluto por duas horas
3. Solução de violeta de cresil (solução de uso) por 40-60 minutos
4. Diferenciar rapidamente em álcool 95%, duas passagens por álcool absoluto e dois xilóis
5. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

substância de Nissl - púrpura intenso
núcleos - púrpura
coloração de fundo - claro

Referência: Vogt, O.: Institut für Hirnsforschung und Allgemeine Biologie, Neustadt/Schwarzwals, Germany. Personal Communication (AFIP modification)

MÉTODO DE PERLS
(para demonstrar ferro)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Solução:

Solução de ferrocianeto de potássio a 10% (sol. estoque)
(ver página 40)

Solução de ácido clorídrico a 10% (sol. estoque)

Ácido clorídrico, concentrado.....	10,0 ml
Água destilada.....	90,0 gm

Solução de ferrocianeto de potássio-ácido clorídrico
(solução de uso)

Ferrocianeto de potássio (sol. estoque).....	70,0 ml
Ácido clorídrico (solução de estoque).....	30,0 ml

Misturar no momento de usar

Solução de vermelho rápido nuclear (Kernechtrot)
(ver página 40)

Método de coloração:

1. Usar lâmina de controle. Usar vidraria quimicamente limpa (pág. 74)
2. Desparafinar, hidratar e levar as lâminas até água destilada
3. Solução de ferrocianeto de potássio (solução de uso), por 5 minutos
4. Solução de ferrocianeto de potássio-ácido clorídrico (solução de uso), por 20 minutos
5. Mergulhar em água destilada, várias passagens
6. Coloração de fundo com vermelho rápido nuclear, por 5 minutos
7. Lavar bem em água corrente
8. Desidratar em dois álcoois a 95%, dois álcoois absolutos, duas passagens em xilol
9. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

pigmento férrico - azul brilhante
núcleos - vermelho
citoplasma - rosa pálido

Observação: Outros pigmentos metálicos em grande quantidade podem ser demonstrados com este método. Se presentes, as reações crômicas são:

cobre - vermelho
urânio - marrom
níquel - verde esbranquiçado ou marrom, em alguns casos

Referência: Perls, M.: Virchow. Arch. Path. Anat. 39:42, 1867

METODO DE GOMORI
(para evidenciar ferro)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de ácido clorídrico a 20% (solução estoque)

Acido clorídrico, concentrado.....	20,0 ml
Água destilada.....	80,0 ml

Solução de ferrocianeto de potássio a 10% (sol. estoque)

Ferrocianeto de potássio.....	10,0 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Solução de ferrocianeto de potássio-ácido clorídrico
(solução de uso)

Ácido clorídrico (solução estoque).....	50,0 ml
Ferrocianeto de potássio (sol. estoque).....	50,0 ml

Misturar no momento de usar

Solução de vermelho rápido para coloração nuclear
(Kernechtrot)

Dissolver 0,1 gm de vermelho rápido nuclear em 100 ml de solução a 5% de sulfato de alumínio. Fazer a dissolução a quente. Esfriar, filtrar e juntar grãos de timol como preservativo.

Método de coloração:

1. Usar lâmina de controle e vidraria quimicamente limpa (pág. 74)
2. Desparafinar, hidratar e levar os cortes até água destilada
3. Solução de ferrocianeto de potássio-ácido clorídrico, por 30 minutos
4. Mergulhar várias vezes em água destilada

5. Coloração de fundo com vermelho rápido por 5 minutos

6. Mergulhar em água destilada

7. Desidratar em dois álcoois 95%, dois álcoois absolutos e depois duas passagens por xilol

8. Montagem em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

pigmentos de ferro - azul brilhante
núcleos - vermelho
citoplasma - rosa pálido

Referência: Gomori, G.: Amer. J. Path. 12:655-663, 1936

MÉTODO DE GRIDLEY
(para fungos)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de ácido crômico a 4%

Ácido crômico (trióxido de crômio).....	4,0 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Reagente de Feulgen - Coleman

Dissolver 1,0 gm de fucsina básica em 200,0 ml de água destilada, quente. Levar à ebulição. Resfriar e adicionar 2,0 gm de metabissulfito de sódio e 10,0 ml de ácido clorídrico normal. Deixar em repouso por 24 horas e juntar 0,5 gm carvão ativado (Norit). Agitar por um minuto e filtrar através de papel de filtro grosso. Filtrar várias vezes até obter solução incolor. Conservar a solução em geladeira.

Solução de fucsina aldeídica

Fucsina básica.....	1,0 gm
Álcool, 70%.....	200,0 ml
Ácido clorídrico, concentrado.....	2,0 ml
Paraldeído.....	2,0 ml

Deixar em repouso, à temperatura ambiente, por 2-3 dias até atingir cor púrpura intensa. Guardar na geladeira. Filtrar e deixar à temperatura ambiente antes de usar.

Solução de amarelo metanil a 0,25%

Amarelo metanil.....	0,25 gm
Água destilada.....	100,0 ml
Ácido acético glacial.....	0,25 ml

Método de coloração:

1. Usar lâmina de controle
2. Desparafinar, hidratar, levando as lâminas até água destilada

3. Oxidar em ácido crômico a 4% por uma hora
4. Lavar em água corrente por 5 minutos
5. Reagente de Coleman por 15 minutos
6. Lavar em água corrente por 15 minutos
7. Mergulhar em álcool 70%, várias passagens
8. Fucsina aldeídica por 30 minutos
9. Mergulhar em álcool 95% para remover excesso de corante
10. Mergulhar em água destilada
11. Fazer a coloração de fundo, leve, com amarelo de metanil por um minuto
12. Mergulhar em água destilada
13. Desidratar em dois álcoois 95%, dois álcoois absolutos, depois duas passagens por xilol
14. Montar em bálsamo, Permountou Histoclad

Resultados:

micélios	- púrpura intenso
conídias	- rosa intenso a púrpura
coloração de fundo	- amarelo
tecido elástico e mucina	- púrpura intenso

Observações: É uma técnica muito útil para identificar fungos. Os detalhes morfológicos das formas de levedo e hifas são geralmente visíveis; as formas fúngicas mais velhas provavelmente não viáveis, durante a fixação, não aparecem tão bem como no método da metenamina de Grocott. Os filamentos de Nocardia e Actinomices não são corados pelo método de Gridley.
Nota: Luna, L.G.; publicou "Evaluation of Staining Technic for Pathogenic Fungi" no Amer. J. Med. Techn. 30:139-146, 1964

Referência: Gridley, M.F.: Amer. J. Clin. Path. 23:303-307, 1953. Copyright by Williams & Wilkins, Co.

MÉTODO DE GROCOTT
(para fungos)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de ácido crômico a 4%
(ver método de Gridley)

Solução de nitrato de prata a 5%

Nitrato de prata..... 5,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de Metenamina a 3%

Metenamina (Hexamethylenetetramine)..... 3,0 gm
(Eastman Kodak Co., ou Fisher Scientific Co.)

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de bórax a 5% (Eastman Kodak Co.)

Bórax..... 5,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de metenamina-nitrato de prata (sol. estoque)

Solução de nitrato de prata a 5%..... 5,0 ml

Solução de metenamina a 3%..... 100,0 ml

A mistura produz um precipitado branco que se dissolve imediatamente com a agitação. A solução incolor pode ser usada por meses. Conservar na geladeira.

Solução de metenamina-nitrato de prata (sol. uso)

Metenamina-nitrato de prata (solução estoque)... 25,0 ml

Água destilada..... 25,0 ml

Solução borax, 5%..... 2,0 ml

Preparar na hora de usar.

Solução de bissulfito de sódio a 1%

Bissulfito de sódio..... 1,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de cloreto de ouro a 0,1%

Cloreto de ouro, solução a 1%..... 10,0 ml

Água destilada..... 90,0 ml

Solução de tiossulfato (hipo) de sódio a 2%

Tiossulfato de sódio..... 2,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Solução de verde luz a 0,2% (solução estoque)

Verde luz, SF, amarelada *..... 0,2 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Ácido acético glacial..... 0,2 ml

Solução de verde luz (solução para uso)

Verde luz (solução estoque)..... 10,0 ml

Água destilada..... 50,0 ml

Método de coloração:

1. Usar lâmina de controle
2. Desparafinar, hidratar e levar as lâminas até água destilada
3. Oxidar em ácido crômico a 4% por uma hora
4. Lavar em água comum por alguns segundos
5. Solução de bissulfito de sódio 1% por 1 minuto para remover ácido crômico residual
6. Lavar em água corrente por 5-10 minutos
7. Mergulhar em água destilada; 3-4 passagens

* National Aniline Co.

8. Colocar em solução recém-preparada de metenamina-nitrato de prata. Levar à estufa (58-60 graus), por uma hora ou até que os cortes se corem, tornando-se amarelo-escuros

9. Mergulhar em água destilada; 6 passagens

10. Matizar na solução de cloreto de ouro por 2-5 minutos

11. Mergulhar em água destilada

12. Remover a prata não reduzida com solução de tiossulfato (hipo) de sódio 2% por 2-5 minutos

13. Lavar bem em água corrente

14. Coloração de fundo com verde luz (solução de uso), por 30-45 segundos

15. Desidratar em dois álcoois a 95%, dois álcoois absolutos, depois passar por dois xilóis

16. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

fungos	- limites bem precisos em negro
mucina	- castanho a cinza-escuro
parte interna de hifas e micélios	- rosa-escuro
coloração de fundo	- verde-pálido

Observação: Esta técnica cora todas as formas de fungos, inclusive os filamentos de Actinomices bovis e Nocardia asteróides, em marrom-negro. A prática mostra que ao corar fungos, principalmente em casos de filamentos de Nocardia, o tempo de exposição a metenamine-nitrato de prata varia de acordo com a espécie ou família. Em caso de suspeita de Nocardia, é aconselhável corar duas lâminas: uma por 60 minutos e a outra por 90 minutos, a fim de permitir evidenciar o fungo que possa existir. Podem-se usar lâminas já coradas e montadas para identificar fungos, através do método de Grocott; basta remover as lamínulas e levar as lâminas até água destilada e depois tratar com ácido crômico, que ajuda a descorar os cortes.

Referência: Grocott, R.G.: Amer. J. Clin. Path. 25:975-979, 1955.
Copyright by Williams & Wilkins Co.

MÉTODO DE MacCALLUM-GOODPASTURE
(para bactérias Gram positivos e negativos)

Fixação: qualquer tecido bem fixado

Técnica: cortes em parafina de 6 micra

Soluções:

Solução de Goodpasture

Fucsina básica	0,59 gm
Anilina	1,0 ml
Ácido fênico cristalizado (derretido)	1,0 ml
Álcool, 30%	100,0 ml

Solução de Gram, iodada

Iodo	1,0 gm
Iodeto de potássio	2,0 gm
Água destilada	300,0 ml

Solução de violeta de genciana (Stirling)

Violeta de genciana (cristais)	5,0 gm
Álcool, 100%	10,0 ml
Anilina	2,0 gm
Água destilada	88,0 ml

Solução de ácido pícrico

Ácido pícrico	2,0 gm
Água destilada	100,0 ml

Método de coloração:

1. Usar sempre lâmina controle
2. Desparafinar e levar os cortes até água destilada
3. Solução de Goodpasture por 10 minutos
4. Mergulhar em água destilada

5. Diferenciar em formalina concentrada por alguns minutos (serve para fixar a coloração de Goodpasture)

6. Lavar em água corrente por 3 minutos

7. Passar em solução saturada de ácido pícrico de 3-5 minutos

8. Mergulhar em água destilada

9. Diferenciar em álcool 95% por 30 segundos

10. Mergulhar em água destilada

11. Solução de violeta de genciana (Stirling) por 3 minutos

12. Lavar em água destilada

13. Solução iodada de Gram por 1 minuto

14. Mergulhar em água destilada. Enxugar com papel mata-borrão, deixando-a, porém, úmida

15. Diferenciar, em uma solução de partes iguais de anilina e xilol, várias mudanças até os cortes terem coloração vermelho-púrpura leve

16. Duas passagens por xilol

17. Montagem em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

organismos Gram-positivos - azul
organismos Gram-negativos - vermelho
outros elementos - várias tonalidades desde o vermelho até a púrpura

Referência: MacCallum, W.G.: JAMA 72:193, 1919

MÉTODO DE KINYOUN
(coloração para bacilos álcool-ácido resistentes)

Fixação: formalina neutra a 10%, tampão

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução fucsina fenólica de Kinyoun

Fucsina básica	4,0 gm
Acido fênico (fundido)	8,0 ml
Álcool, 95%	20,0 ml
Água destilada	100,0 ml

Filtrar antes de usar. A solução pode ser usada várias vezes.

Solução diferenciadora

Álcool, 70%	1000,0 ml
Acido clorídrico, concentrado	10,0 ml

Solução de azul de metileno (estoque)

Azul de metileno	1,4 gm
Álcool, 95%	100,0 ml

Solução de azul de metileno (para uso)

Azul de metileno (solução estoque)	10,0 ml
Água corrente	90,0 ml

Método de coloração:

1. Usar sempre uma lâmina controle
2. Desparafinar e hidratar os cortes em água destilada
3. Coloração com a solução fenólica de Kinyoun a 56 graus por 1 hora

4. Lavar bem em água corrente

5. Passagem por dois frascos com solução diferenciadora, até o corte ficar rosa pálido

6. Lavar bem em água corrente

7. Coloração de fundo com a solução de azul de metileno (solução de uso)

8. Desidratar em álcool a 95%, álcool absoluto e duas passagens por xilol. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad.

Resultados:

bacilos álcool-ácido-resistentes - vermelho vivo
coloração de fundo - azul claro

Referência: Kinyoun, J.J.: Amer. J. Public Health 5:867, 1915 (AFIP modification)

MÉTODO DE LAQUEUR
(para demonstrar corpúsculos de Mallory)

Fixação: Zenker ou solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Hematoxilina de Mayer
(ver página 9)

Solução de fucsina-ácida e anilina

Fucsina ácida.....	20,0 gm
Anilina.....	2,0 ml
Água destilada.....	100,0 ml

Misturar a anilina na água antes de adicionar à fucsina ácida.

Solução alcoólica de ácido pícrico

Acido pícrico, saturado, em álcool 100%.....	10,0 ml
Álcool, 20%.....	70,0 ml

Solução de ácido fosfomolíbdico a 1%

Acido fosfomolíbdico.....	1,0 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Solução de verde luz a 1%

Verde luz, SF, amarelada.....	1,0 gm
Água destilada.....	100,0 ml
Acido acético glacial.....	1,0 ml

Método de coloração:

1. Desparafinar, hidratar e levar as lâminas até água destilada
2. Hematoxilina de Mayer, por 15 minutos

3. Lavar em água corrente por 15 minutos

4. Cobrir as lâminas com solução de fucsina-ácida e anilina; aquecer ligeiramente ao bico de Bunsen até que comecem a sair vapores da anilina. Deixar os cortes repousarem por 5 minutos

5. Lavar em água, 3 passagens

6. Diferenciar em solução alcoólica de ácido pícrico até que as hemácias e os corpos hialinos fiquem vermelhos e o colageno se mostre incolor ou cinza claro

7. Lavar em água corrente por 3 minutos

8. Colocar na solução de ácido fosfomolíbdico por 4 horas

9. Coloração de fundo em solução de verde luz por uma hora

10. Lavar em água corrente por um minuto

11. Diferenciar em álcool a 80%. Controlar ao microscópio. As fibras colágenas são bem individualizadas quando os cortes estão bem diferenciados

12. Desidratar em 2 álcoois a 95%, dois álcoois absolutos, depois 2 passagens em xilol

13. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

corpos de Mallory - vermelho brilhante
hemácias - vermelho
citoplasma - marrom claro
pigmento biliar - verde
material protéico visto ocasionalmente em hepatocitos - vermelho
Hemosiderina e lipofucsina - não se coram

Referência: Laqueur, G.L.: Amer. J. Clin. Path. 20:689-690, 1950.
Copyright by Williams & Wilkins Co.

MÉTODO DE WARTHIN-STARRY
(para espiroquetas e corpos de Donovani)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão a 10%. Não usar fixadores à base de cromatos

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções: usar vidraria limpa quimicamente.

Solução de água acidulada

Água tridestilada.....	1000,0 ml
Adicionar ácido cítrico (sol. aquosa a 1%)até....	pH 4,0

Solução de nitrato de prata a 1% (para impregnação)

Nitrato de prata, C.P. (cristais).....	1,0 gm
Água acidulada.....	100,0 ml

Solução de nitrato de prata a 2% (para o revelador)

Nitrato de prata, C.P. (cristais).....	2,0 gm
Água acidulada.....	100,0 ml

Solução de gelatina a 5%

Gelatina pura (em folha).....	10,0 gm
Água cidulada.....	200,0 ml

Solução de hidroquinona a 0,15%

Hidroquinona, cristalina (qualidade fotográfica).	0,15 gm
Água acidulada.....	100,0 ml

Nota: Conservar as soluções de nitrato de prata (2%), gelatina (5%) e hidroquinona (0,15%) em frascos de Erlenmeyr de 50 ml, em banho-maria (54 graus), até preparar a:

Solução reveladora

Nitrato de prata a 2%.....	1,5 ml
Gelatina a 5%.....	3,75 ml
Hidroquinona a 0,15%.....	2,0 ml

Misturar num pequeno beaker os ingredientes acima na ordem descrita, assegurando-se que a mistura dos mesmos seja completa. Preparar a solução só na hora de usar.

Método de coloração: Usar lâmina de controle

1. Desparafinar e hidratar as lâminas até água tridestilada
2. Impregnação na solução de nitrato de prata a 1%, por 30 minutos em banho-maria a 43 graus. Preparar a solução reveladora. Usar a solução imediatamente após colocar a hidroquinona. Usar pinças com as pontas parafinadas, nas etapas 2 e 3
3. Recobrir os cortes com a solução reveladora, feita no momento do uso. Os cortes tornam-se marrom claro ou amarelo. Controlar ao microscópio. Os espiroquetas aparecem negros em fundo amarelo ou marrom claro
4. Lavar rapidamente e copiosamente em água morna comum (apr. a 56 graus)
5. Mergulhar em água destilada
6. Desidratar em dois álcoois 95%, dois álcoois absolutos. Diafanizar em dois xilóis
7. Montar as lâminas em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

Espiroquetas, corpos de Donovani - negro
Coloração de fundo - de amarelo a marrom claro

Observações: Para demonstrar corpos de Donovani, pode ser necessário prolongar o tempo na solução reveladora. Certos pigmentos hematógenos, núcleos e melanina possuem grande afinidade argêntica, competindo com os espiroquetas e dificultando a visualização dos mesmos. Para melhor distinção dos espiroquetas se recomenda baixar o pH da água acidulada para 3,6 e prolongar o tempo na solução reveladora. O inconveniente é que o restante do corte fica por demais escuro. Se houver suspeita de espiroquetas ou se os mesmos estão pouco corados pode-se repetir a coloração dos mesmos cortes.

Referência: Kerr, D.A.: Amer. J. Clin. Path. Tech. Supp. 8:63-67, 1938. Copyright by Williams and Wilkins Co. (AFIP modifications)
C.H. Bridges, and L.G. Luna estudaram várias modificações da técnica e se encontra publicada em Lab. Invest. July-August, 1957

MÉTODO ÓLEO VERMELHO (Oil red-O-) EM GLICOL PROPÍLICO (para demonstrar gorduras)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em congelação a 10-15 micra

Soluções:

Solução de Óleo Vermelho, a 0,5% (oil red-O)

Óleo vermelho, O.....	0,5 gm
Glicol propílico, 100%.....	100,0 ml

Adicionar uma pequena quantidade de glicol propílico ao vermelho óleo O e misturar bem, triturando os fragmentos maiores. Ajuntar gradualmente o restante do glicol propílico, agitando com bastão de vidro. Aquecer em fogo brando até a temperatura de 95 graus. Não deixar que a temperatura vá acima dos 100 graus. Mexer com bastão de vidro durante o aquecimento. Filtrar com papel de filtro grosso, enquanto a solução estiver ainda quente. Deixar em repouso, à temperatura ambiente, até o dia seguinte. Filtrar através de filtro de Seitz a vácuo. Se a solução continuar turva, filtrar novamente. Nota: quando usar o filtro de Seitz, colocar a face áspera do filtro para cima. A solução guardada na estufa a 60 graus dura indefinidamente.

Solução de glicol propílico a 85%

Glicol propílico, 100%.....	85,0 ml
Água destilada.....	15,0 ml

Hematoxilina de Mayer

Hematoxilina em cristais.....	1,0 gm
Água destilada.....	1000,0 ml
Iodeto de sódio.....	0,2 gm
Alúmen de potássio ou amônio.....	50,0 gm
Ácido cítrico.....	1,0 gm
Hidrato de cloral.....	50,0 gm

Dissolver o alúmen em água, sem aquecer; adicionar e dissolver a hematoxilina. Juntar então o iodeto de sódio, ácido cítrico e o hidrato de cloral, agitando até formar solução completa. A cor final do corante é vermelho-violeta. A solução se conserva por meses.

Hematoxilina de Harris

Hematoxilina em cristais.....	5,0 gm
Álcool, 100%.....	50,0 ml
Alúmen de potássio ou sódio.....	100,0 gm
Água destilada.....	1000,0 ml
Óxido vermelho de mercúrio.....	2,5 gm

Dissolver a hematoxilina no álcool. Dissolver o alúmen na água (aquecendo). Remover do fogo e misturar as duas soluções. Levar à ebulição tão rápido quanto possível (não aquecer por mais de um minuto - sempre agitando a mistura). Retirar do fogo e juntar lentamente o óxido vermelho de mercúrio. Aquecer até a solução ficar de cor púrpura-escura. Retirar do fogo imediatamente e colocar o recipiente em um banho de água fria até a solução esfriar completamente. O corante está então pronto para ser usado. Filtrar sempre antes de usar. A adição de 2-4 ml de ácido acético glacial por 100 ml do corante melhora a coloração nuclear.

Solução de água acidulada a 5%

Ácido clorídrico.....	5,0 ml
Água destilada.....	95,0 ml

Gelatina de glicerina

Gelatina.....	10,0 gm
Água destilada.....	60,0 ml

Aquecer até dissolução da gelatina. Adicionar:

Glicerina.....	70,0 ml
Fenol.....	1,0 ml

Método de coloração:

1. Os cortes em congelação são recolhidos em água destilada
2. Colocar os cortes em glicol propílico por dois minutos
3. Solução de vermelho, O, por uma hora. Se usar cortes já montados em lâmina, deixar no corante até o dia seguinte
4. Diferenciar em glicol propílico a 85% por um minuto
5. Mergulhar em dois banhos de água destilada

6. Corar em hematoxilina de Mayer ou hematoxilina de Harris por alguns segundos

7. Mergulhar em dois banhos de água destilada

8. Diferenciar em água acidulada, se os cortes estiverem hipercorados

9. Lavar em água corrente

10. Neutralizar em água amoniacal fraca, se houver diferenciação em água acidulada

11. Lavar em água corrente, duas vezes

12. Montar em geléia de glicerina

Resultados:

gordura - vermelho
núcleos - azul

Referência: Histopathology Laboratories, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C. 20305

MÉTODO DE MUCICARMIN DE MAYER
(para mucina e criptococos)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Hematoxilina férrica de Weigert

Solução A

Hematoxilina em cristais	1,0 gm
Álcool, 95%	100,0 ml

Solução B

Cloreto férrico (percloreto), solução aquosa a 29%	4,0 ml
Água destilada	95,0 ml
Ácido clorídrico, concentrado	1,0 ml

Misturar partes iguais de solução A e B no momento de usar

Solução de mucicarmin

Carmin	1,0 gm
Cloreto de alumínio, anidro	0,5 gm
Água destilada	2,0 ml

Misturar, triturando, em uma pequena cápsula, os dois sáis, juntando depois água destilada. Aquecer em pequena chama por dois minutos. A mistura torna-se xaroposa e de cor vermelha homogênea, quase negra. Colocar a cápsula e seu conteúdo num beker com 100 ml de álcool 50%, deixar por 24 horas. Diluir 1 parte de mucicarmin com 4 partes de água corrente no momento de usar.

Solução de amarelo metanil a 0,25%

Amarelo metanil	0,25 gm
Água destilada	100,0 ml
Ácido acético glacial	0,25 ml

Método de coloração:

1. Desparafinar e desidratar e levar as lâminas até água destilada
2. Hematoxilina de Wéigert (solução de uso), por 7 minutos
3. Lavar em água corrente por 10 minutos
4. Colocar na solução de mucicarmin diluída (1:4) por uma hora
5. Mergulhar rapidamente em água destilada
6. Solução de amarelo metanil por um minuto
7. Mergulhar rapidamente em água destilada
8. Desidratar em dois álcoois a 95%, dois álcoois absolutos e depois passar por dois xilóis
9. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

mucina	- rosa escuro a vermelho
cápsula de criptococus	- rosa escuro a vermelho
núcleos	- negro
outros tecidos	- amarelo

Observação: Este método é usado com bons resultados nos laboratórios da AFIP para demonstrar criptococos. Como coloração de contraste, podem-se também usar hematoxilina e eosina ou o método para fibras elásticas.
Nota: As propriedades carminofílicas podem ser obscurecidas se houver excesso de coloração com hematoxilina de Weigert e ou amarelo metanil.

Referência: Mallory, F.B.: Pathological Technique, New York, Hafner Publishing Co., 1961, p. 130

MÉTODO DE McMANUS (PAS)
(para demonstrar glicógeno)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina de 6 micra

Solução:

Solução de ácido clorídrico normal

Ácido clorídrico, densidade específica 1.19.....	83,5 ml
Água destilada.....	916,5 ml

Solução de Feulgen e Coleman

Dissolver 1,0 gm de fucsina básica em 200,0 ml de água destilada quente. Levar à ebulição. Resfriar e juntar: 2,0 gm de metabissulfito de potássio e 10,0 ml de ácido clorídrico normal. Deixar repousar por 24 horas e adicionar 0,5 gm de carvão ativo (Norit). Agitar por um minuto e filtrar em papel de filtro grosso. Repetir a filtração até alcançar solução incolor. Guardar em geladeira.

Solução de Schiff

Dissolver 1,0 gm de fucsina básica em 200,0 ml de água destilada quente. Levar à ebulição. Esfriar a 50 graus. Filtrar e adicionar 20,0 ml de ácido clorídrico normal. Esfriar mais e juntar 1,0 gm de bissulfito de sódio anidro ou metabissulfito de sódio. Conservar em ambiente escuro por 48 horas até que a solução adquira cor palha. Guardar em geladeira e em frasco escuro.

Teste para a solução Schiff

Em um vidro de relógio, colocar 10 ml de formalina concentrada (37-40%). Pingar algumas gotas do reagente de Schiff. A solução é boa quando se torna vermelho-púrpura rapidamente. Reação lenta e solução cor azul-púrpura é sinal de degradação do corante.

Solução de ácido periódico a 0,5 %

Ácido periódico.....	0,5 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Solução verde luz a 0,2% (solução estoque)

Verde luz, SF, amarelada.....	0,2 gm
Água destilada.....	100,0 ml
Ácido acético glacial.....	0,2 ml

Solução verde luz (solução para uso)

Verde luz (solução estoque).....	10,0 ml
Água destilada.....	50,0 ml

Hematoxilina de Harris
(ver página 9)

Método de coloração:

1. Ver processo para digestão com diastáse na página 69
2. Desparafinar, hidratar e levar até água destilada
3. Oxidar em ácido periódico por 5 minutos
4. Mergulhar em água destilada
5. Reagente de Feulgen-Coleman ou Schiff por 15 minutos
6. Lavar em água corrente por 10 minutos até desenvolver a cor rosa
7. Hematoxilina de Harris por 6 minutos ou coloração de fundo com verde luz por alguns segundos. Recomenda-se verde luz quando se pesquisam fungos. Quando usa verde luz, omitem-se etapas 8 a 12 inclusive
8. Lavar em água corrente
9. Diferenciar em álcool-ácido a 1% (HCL). De 3-10 imersões
10. Lavar em água corrente
11. Imersão em água amoniacal até observar a cor azul nos cortes
12. Lavar em água corrente por 10 minutos
13. Desidratar com dois álcoois a 95%, dois álcoois absolutos e depois duas passagens em xilol
14. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

reação positiva - rosa a vermelho púrpura:

Glicogênio, mucina, reticulina, fibrina ou trombos, deposição de colóide, substância hialina em arterioesclerose, depósitos hialins em glomérulos, células

granulares nas arteríolas renais, quando preservadas, colóide do pedúnculo da hipófise, colóide tiroideana, infiltração amilóide.

os núcleos coram em azul
os fungos coram em vermelho
coloração de fundo - verde pálido (quando corado com verde luz)

Referência: McManus, J.F.A.: Stain Techn. 23:99-108, 1948 (AFIP modification).
Copyright by Williams & Wilkins Co.

METODO DE AZUL DE ALCIANO
(para muco-substâncias - pH 2,5)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de ácido acético a 3%

Ácido acético glacial..... 3,0 ml

Água destilada..... 97,0 ml

Solução de azul alciano a 1%

Azul alciano 8GX..... 1,0 gm

Ácido acético glacial a 3%..... 100,0 ml

Ajustar pH a 2,5. Filtrar e juntar alguns cristais de timol.

Solução de vermelho rápido nuclear (Kernechrot)

Dissolver 0,1 gm de vermelho rápido nuclear em 100 ml de uma solução de sulfato de alumínio a 5%. Aquecer para ajudar dissolução. Resfriar, filtrar e juntar timol como preservativo.

Método de coloração:

1. Desparafinar e hidratar levando as lâminas até água destilada
2. Solução de ácido acético a 3% por 3 minutos
3. Solução de azul alciano por 30 minutos
4. Lavar em água corrente por 10 minutos
5. Mergulhar em água destilada
6. Coloração de contraste com vermelho rápido por 5 minutos
7. Lavar em água corrente por 1 minuto
8. Desidratar em dois álcoois 95%, dois álcoois absolutos e depois passar por dois xilóis
9. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

Muco-substâncias sulfatadas pouco ácidas, ácido hialurônico e sialo-ialurônico coram-se em azul escuro. Os núcleos se coram fracamente se os cortes forem fixados em formalina e se não se usou o vermelho rápido.

MÉTODO DE AZUL DE ALCIANO
(para muco-substâncias - pH 1,0)

Soluções:

Solução de azul alciano

Azul alciano, 8GX..... 1,0 gm

Ácido clorídrico, 0, 1N..... 100,0 ml

Método de coloração:

1. Desparafinar, hidratar levando as lâminas até água destilada
2. Azul alciano por 30 minutos
3. Enxugar as lâminas com papel de filtro, sem passar por água
4. Desidratar em dois álcoois a 95%, dois álcoois absolutos, dois xilóis
5. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

É um método mais seletivo para muco-substâncias sulfatadas, que se se coram em azul escuro.

Referência: Lev, R. and Spicer, S.S.: J. Histochem. Cytochem. 12:309, 1964. Copyright by Williams and Wilkins Co.

MÉTODO DE AZUL DE ALCIANO
(para muco-substâncias - pH 0,4)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10% ou outro fixador

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de fosfato-ácido clorídrico

Ácido clorídrico, concentrado..... 42,0 ml

Fosfato de sódio, monobásico..... 13,8 gm

Água destilada (completar até)..... 1000,0 ml

Solução de azul alciano pH 0,4

Azul alciano..... 2,5 mg

Solução de fosfato-HCL..... 250,0 ml

Solução de vermelho rápido (kernechtrot)
(ver página 40)

Método de coloração:

1. Desparafinar, hidratar, levando os cortes até água destilada
2. Solução de fosfato-HCL por 3 minutos
3. Azul alciano por 30 minutos
4. Lavar em água corrente por 10 minutos
5. Mergulhar em água destilada
6. Coloração de contraste com vermelho rápido por 5 minutos
7. Lavar em água corrente por um minuto
8. Desidratar em dois álcoois a 95%, dois álcoois absolutos e duas passagens em xilol
9. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

Somente as muco-substâncias sulfatadas, fortemente ácidas, darão uma reação positiva.

Referência: Johnson, W.C., Graham, J.H., and Helwig, E.G.: J. Invest. Derm. 42:215-224, 1964.

MÉTODO DE MOWRY (1958, modificado) de ferro coloidal (para mucopolissacarides)

Fixação: solução de formalina, neutra, tampão, a 10%

Técnica: cortes em parafina a 6 micra

Soluções:

Solução de cloreto férrico a 29%

Cloreto férrico.....	29,0 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Solução de óxido de ferro coloidal de Müller (sol. estoque)

Levar 250 ml de água destilada até a ebulição. Enquanto a água estiver ainda fervendo, juntar 4,4 ml da solução de cloreto férrico a 29% (USP-XI), mexendo com bastão de vidro. Quando a solução virar para vermelho escuro, retirar do fogo e deixar esfriar. Guardar em vidro adequadamente rotulado. O reagente conserva-se por muitos meses. Diluir o necessário no momento de usar, como segue:

Solução de ferro coloidal (solução de uso)

Solução de ferro coloidal de Müller (sol. estoque)..	20,0 ml
Água destilada.....	15,0 ml
Ácido acético glacial.....	5,0 ml

Misturar no momento de usar.

Solução de ácido acético a 12%

Ácido acético glacial.....	12,0 ml
Água destilada.....	88,0 ml

Solução de ferrocianeto de potássio a 5%

Ferrocianeto de potássio.....	5,0 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Solução de ácido clorídrico a 5%

Ácido clorídrico, concentrado..... 5,0 ml

Água destilada..... 95,0 ml

Solução de ferrocianeto de potássio-ácido clorídrico

Ferrocianeto de potássio, a 5%..... 50,0 ml

Ácido clorídrico, a 5%..... 50,0 ml

Misturar no momento de usar

Solução de Van Gieson

Fucsina ácida, solução aquosa a 1%..... 2,5 ml

Ácido pícrico, solução aquosa saturada..... 97,5 ml

Método de coloração: Use lâmina de controle. Para fazer prova de digestão, ver página 69.

1. Desparafinar e hidratar levando as lâminas até água destilada
2. Mergulhar em ácido acético glacial por 3 minutos
3. Solução de ferro coloidal (sol. de uso), por uma hora
4. Mergulhar em ácido acético glacial, 4 passagens, 3 minutos cada
5. Solução de ferrocianteo de potássio-ácido clorídrico, por 20 minutos
6. Lavar em água comum por 5 minutos
7. Mergulhar em água destilada
8. Solução de Van Gieson por 5-7 minutos
9. Sem lavar, passar rapidamente por dois álcoois a 95%, dois álcoois absolutos, duas passagens em xilol
10. Montar em bálsamo, Permount ou Histoclad

Resultados:

Mucopolissacarides ácidos e mucina epitelial ácida - azul intenso (azul da Prússia)
Coloração de fundo: depende do corante usado

Referência: Mowry, R.W.: Dept. of Pathology, University of Alabama, Medical Center, Birmingham, Alabama 35233 (AFIP modification).

METODOS DE DIGESTÃO PARA MUCOPOLISSACARIDES

I. Método da diástase

Solução tampão-fosfato, pH 6,0

Cloreto de sódio.....	8,0 gm
Fosfato de sódio, dibásico.....	0,282 gm
Fosfato de sódio, monobásico.....	1,97 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Solução de diástase

Diástase de malte.....	0,1 gm
Solução tampão-fosfato, pH 6,0.....	100,0 ml

Misture no momento de usar.

Método de digestão: Use lâmina controle

1. Desparafinar e hidratar levando as lâminas até água destilada
2. Colocar as lâminas na solução de diástase a 37 graus por uma hora. A temperatura acima de 37 graus inativa a diástase
3. Lavar em água corrente por 5 minutos
4. Corar com o reagente de Schiff ou outro método apropriado

Resultados: A coloração do glicogênio é eliminada seletivamente.

II. Método de digestão com a hialuronidase

Solução de fosfato de potássio monobásico a 0,1M

Fosfato de potássio, monobásico.....	13,61 gm
Água destilada.....	1000,0 ml

Solução de fosfato de sódio, dibásico a 0,1M

Fosfato de sódio, dibásico.....	14,20 gm
Água destilada.....	1000,0 ml

Solução tampão

Fosfato de potássio, monobásico, a 0,1M..... 94,0 ml

Fosfato de sódio, dibásico, a 0,1M..... 6,0 ml

Solução de hialuronidase

Hialuronidase testicular..... 0,05 gm
(Cal Bio Chemical Co. Los Angeles, Calif.)

Solução tampão..... 100,0 ml

Misturar no momento de usar.

Método de digestão: Usar lâmina controle

1. Desparafinar, hidratar e levar as lâminas até água destilada
2. Colocar lâminas em solução de hialuronidase a 37 graus por uma hora. Colocar outras lâminas, não tratadas pela hialuronidase, em solução tampão, a 37 graus por uma hora
3. Lavar os dois tipos de lâminas em água correnteppor 5 minutos
4. Usar o método de coloração que preferir (Schiff ou outro)

Resultados:

A coloração devida à presença de ácido hialurônico, sulfato condrotin 4 ou sulfato condrotin 6, é seletivamente eliminada pela digestão.

III. Método de digestão com a sialidase

Usar duas lâminas do mesmo bloco: uma para a solução tampão e a outra para a digestão.

Soluções:

Solução tampão, nº 1

Acetato de sódio 1,0 M + Cloreto de Cálcio 0,4 M

Acetato de sódio..... 26,2 gm

Cloreto de cálcio..... 8,9 gm

Água destilada..... 200,0 ml

Solução tampão, nº 2

Acetato de sódio 0,1M + Cloreto de cálcio 0,04M

Acetato de sódio..... 2,6 gm

Cloreto de cálcio..... 0,89 gm

Água destilada.....200,0 ml

Solução de sialidase

Sialidase (neuraminidase)..... 1,0 ml
(General Biochemical Co. Chagrin Falls, Ohio)

Solução tampão, nº 1..... 0,1 ml

Método de digestão:

1. Desparafinar e hidratar até a água destilada

2. Fazer um círculo na lâmina, em torno dos cortes a serem tratados pela enzima, a fim de retê-la

3. Deixar secar no ar por duas horas

4. Preparar uma placa de Petri com água. Colocar dois bastões de vidro sobre os bordos da placa de Petri. Colocar as lâminas sobre os bastões de vidro. Cobrir a lâmina marcada, com lápis diamante, com sialidase; a outra lâmina será coberta com solução tampão nº2. Levar a placa de Petri assim montada à estufa (40 graus), por 3 horas

5. Remover da estufa e mergulhar em água destilada

6. Corar com qualquer técnica de coloração para mucopolissacarides (azul alciano, Schiff, etc.)

Resultados:

A coloração devida a sialomucina será seletivamente eliminada

Observação: Para se obter informação sobre métodos para corar outros mucopolissacarides, consultar o livro "Histopathological Technic and Practical Histochemistry" de Lilie, R.D.: McGraw-Hill Book Co. 1965, New York.

DESCALCIFICAÇÃO

A descalcificação consiste na remoção dos sáis de cálcio que se encontram depositados nos tecidos orgânicos, a fim de permitir o corte e o processamento ulterior dos tecidos. Os ossos ou outros materiais calcificados devem ser cortados em pequenos pedaços (cerca de 5 mm), com serra adequada, antes da fixação. Depois de completada a fixação, colocar o fragmento na solução descalcificadora. A relação entre espécimen e volume de solução descalcificadora deve ser de 1:15 ou 1:20. Colocar os fragmentos a descalcificar envoltos em gase ou em cápsula de porcelana perfurada, suspensos no terço superior do líquido descalcificador. A agitação ou movimento do líquido ou da peça acelera a descalcificação. A descalcificação a vácuo também é extremamente útil para acelerar o processo.

Métodos de descalcificação

Método do ácido fórmico-citrato de sódio

1. Colocar o tecido fixado em solução de ácido fórmico-citrato de sódio. A solução deve ser mudada diariamente.

Solução A

Citrato de sódio.....	50,0 gm
Água destilada.....	250,0 ml

Solução B

Ácido fórmico, 90%.....	125,0 ml
Água destilada.....	125,0 ml

Misturar partes iguais no momento de usar.

2. Lavar em água corrente por 4-8 horas.

3. Desidratar, diafanizar e incluir em parafina ou outro processo.

Observação: Este método dá melhor coloração que o método de descalcificação com o ácido nítrico.

Método do ácido nítrico (variante nº 1)

1. Colocar os fragmentos fixados no descalcificador. Trocar a solução diariamente.

Solução de ácido nítrico a 5%

Ácido nítrico concentrado (68-70% densidade específica 1,41)..... 5,0 ml

Água destilada..... 95,0 ml

2. Lavar em água corrente por 30 minutos.

3. Neutralizar em solução de formalina a 10% (adicionada de carbonato de cálcio ou carbonato de magnésio em excesso), pelo menos por 5 horas.

4. Lavar em água corrente, durante a noite.

5. Desidratar, diafanizar e incluir em parafina ou outro processo.

Observação: É um método rápido. Evitar descalcificação excessiva que interfere com a coloração nuclear.

Método do ácido nítrico (variante nº 2)

1. Após a fixação, colocar o tecido em solução descalcificadora. Trocar a solução diariamente.

Álcool, 80%..... 95,0 ml

Ácido nítrico concentrado (68-70% densidade específica 1,41)..... 5,0 ml

2. Terminada a descalcificação, passar diretamente a uma solução aquosa de sulfato de sódio a 4%, por 3 horas.

3. Lavar em água corrente por 2 horas para remover o sulfato de sódio; ou melhor, deixá-la lavando-se durante uma noite.

4. Desidratar, diafanizar e incluir em parafina ou outro método.

Observação: É método mais rápido que o anterior, devido à dissolução das gorduras pelo álcool.

Método de Perenyi

1. Colocar o tecido fixado na solução descalcificadora.

Solução de Perenyi

Ácido nítrico, solução aquosa a 10%..... 40,0 ml

Álcool absoluto..... 30,0 ml

Ácido crômico, solução aquosa a 0,5%..... 30,0 ml

Guardar os vários reagentes em solução estoque e misturar no momento de usar. Se a solução tomar cor azul violeta, não se preocupar, pois isso não altera a descalcificação.

2. Lavar em água corrente por duas horas. Guardar em álcool a 95% se não puder terminar o processamento.

3. Desidratar, diafanizar e incluir em parafina ou outro método.

Observação: Este método é lento para osso compacto, mas excelente para pequenas calcificações (artérias, nódulos calcificados, etc.). Também serve para descalcificar globo ocular de ave ou humano em casos de calcificação patológica. Há pouco endurecimento dos tecidos e permite ótima coloração.

Métodos para controlar a descalcificação

O controle da descalcificação é tão importante quanto o método de descalcificação utilizado. Infelizmente o controle da descalcificação é detalhe a que não se dá, geralmente, a devida importância na rotina do laboratório. Terminada a descalcificação, retirar, imediatamente, o tecido do descalcificador, pois haverá uma diminuição de 10% na coloração, em cada duas horas que o tecido permanecer a mais. Em 90% dos casos, a má coloração dos cortes histológicos de osso, é devida a descuido na remoção da peça da solução descalcificadora. Os seguintes métodos servem para controlar a descalcificação.

Método químico

Pipetar cerca de 5,0 ml da solução descalcificadora (do fundo do frasco) após 6-12 horas de descalcificação. Adicionar 5 ml de hidróxido de amônio a 5% e 5 ml de oxalato de amônio a 5%. Misturar e deixar em repouso por 15-30 minutos. Mistura turva é consequência de oxalato de cálcio, o que indica que o espécimen ainda tem cálcio. Mudar então a solução descalcificadora e repetir o teste. O desaparecimento da turbidez indica que o espécimen está descalcificado. Repetir o teste quantas vezes fôr necessário.

Radiografia

É sem dúvida o melhor método para avaliar a descalcificação.

Flexibilidade do tecido

Só deve ser usado por quem tenha experiência. Dobrar com cuidado o espécimen: se oferecer pouca resistência, está descalcificado. Pode-se também tocá-lo com a unha: as áreas calcificadas resistem à pressão.

Limpeza de vidraria

A vidraria utilizada para estocar soluções corantes e para alguns métodos de coloração (especialmente em impregnações pela prata) requer limpeza especial.

Recomenda-se a técnica seguinte:

1. Lavá-la com sabão e água quente
2. Enxaguá-la em água quente
3. Colocá-la em solução química, por 2 horas
4. Enxaguá-la bem em água corrente
5. Deixá-la secar de boca para baixo

Solução química para limpeza

Bicromato de potássio.....	20,0 gm
Água destilada.....	200,0 ml
Ácido sulfúrico, C.P.....	20,0 ml

Dissolver o permanganato em água destilada quente. Resfriar e adicionar lentamente o ácido sulfúrico. Sendo uma mistura altamente corrosiva, prepará-la com muito cuidado e mantê-la sempre em frasco bem fechado.

Método de coloração de Papanicolau
(para esfregaços)

Preparação dos esfregaços

1. Devido à degeneração rápida das células, os esfregaços devem ser preparados e fixados imediatamente. Se houver alguma demora, o material deve ser colocado em álcool 95% e colocado na geladeira até o momento de fazer os esfregaços. Para líquidos que requerem centrifugação, adicionar, álcool 50% até o momento da centrifugação, que deve ser feita a 2000 rpm, por 30 minutos.

2. Os esfregaços de secreções viscosas (vaginal, cervical e prostáticas), devem ser feitas e fixadas imediatamente.

3. O sedimento resultante de centrifugados de urina, líquido espinhal, ascites, etc., é usado para esfregaços em lâminas previamente tratadas com albumina de Mayer. O restante do sedimento pode ser tratado como uma biópsia e seguir a rotina histológica.

Fixação:

1. Álcool 95%, por 15 minutos.

2. Os esfregaços devem ser fixados imediatamente, enquanto humidos.

3. Há no mercado fixadores tipo spray, que ao mesmo tempo que fixam, colam o esfregaço na lâmina, e inclusive servem para proteger o esfregaço em caso de envio por correio.

Soluções:

Hematoxilina de Harris para método de Papanicolau

Hematoxilina, cristais.....	5,0 gm
Álcool, 100%.....	50,0 ml
Alumen de potássio ou amônio.....	100,0 gm
Água destilada.....	1000,0 ml
Óxido de mercúrio.....	2,5 gm

Não adicionar ácido acético glacial.

Orange G 6 (OG-6)

Orange G-6, solução a 0,5 % em álcool 95%.....	100,0 ml
Ácido fosfotungstico.....	0,015 gm

Eosina - Azur 50 (EA-50)

Aconselha-se usar a solução preparada pelo Lab. Ortho (Ortho Diagnostics, Raritan, New Jersey, 18869). Filtrar antes de usar.

Método de coloração:

1. Após fixação levar as lâminas aos álcoois 95%, 80%, 70% e 50%. Passar por água comum e depois à água destilada.
2. Hematoxilina de Harris, por 2-3 minutos. A hematoxilina não deve conter ácido acético glacial.
3. Imersão delicada em água comum.
4. Diferenciar em água acidulada a 0,25% (HCl). Uma ou duas imersões apenas.
5. Lavar delicadamente em água comum corrente a fim de eliminar o ácido e até os núcleos estarem bem azúis.
6. Lavar em água destilada e passar por álcoois, 50%, 70%, 80% e 95%.
7. Colocar em Orange G 6 por 2 minutos.
8. Passar por 3 álcoois 95%.
9. Corar por 2 minutos na solução de Eosina-Azur (EA-50)
10. Passar por 3 álcoois 95%, dois álcoois absolutos e 4 passagens em xilol.
11. Montar em Permount ou bálsamo.

Resultados:

núcleos - azul, com detalhes bem marcados
citoplasma - vários tons de rosa, azul, amarelo, verde e cinza

Referência: Papanicolau, G.N.: Atlas of Exfoliative Cytology, Cambridge, Mass., Harvard University Press, p. 1954, page 6.

A N O T A Ç Õ E S P R Á T I C A S

Lee G. LUNA

Chefe, Divisão de Laboratórios de Histopatologia

AFIP - Washington, D.C. 20306

Preparadas em base de cursos anteriores realizados nos E.U.A. e outros países

1 9 7 4

1. ARTEFATOS NA PREPARAÇÃO DE TECIDOS (FIXAÇÃO)*

1.1 ORGANISMO SAPROFÍTICO: Um saprófito é um microorganismo que prospera na matéria em decomposição. Observa-se após iniciar-se a autólise. O organismo é notado por suas características invasivas. É impossível restabelecer as propriedades corantes nucleares de espécimes autolisados.

1.2 AMIDO: Um artefato bastante comum é o amido procedente do talco cirúrgico. Seu aspecto clássico é o de cristais hexagonais que se tornam cinzentos após a coloração H&E, são PAS-positivos e se tornam verdes com os corantes de Giemsa. Quando se procede à polarização, observa-se uma cruz de malta. O talco utilizado nas luvas de borracha durante a inspeção macroscópia do tecido constitui a mais frequente causa de introdução do cristal de amido. Pode também ocorrer a deposição de amido pelo cirurgião, durante o ato cirúrgico.

1.3 ARTEFATO CAUSADO PELO CONGELAMENTO: Cristais de gelo intra e extracelulares provocam o deslocamento de tecido, produzindo vácuos e lacunas que permanecem após o degelo. As causas mais comuns de introdução desse artefato são o congelamento anterior à fixação para criotomia, a armazenagem em ambiente refrigerado durante a fixação, o congelamento durante a criotomia, antes da fixação e da inclusão em parafina, e a exposição a baixas temperaturas naturais durante o transporte, em caixas postais ou compartimentos de carga de aviões, por exemplo. Morfologia: em toda a extensão do tecido serão observados vacúolos e lacunas de vários diâmetros. Alguns núcleos apresentam bolhas e mostram-se de uma coloração cinza claro na preparação de H&E. A polarização do colagênio é um pouco maior do que o normal. Frequentemente ocorre separação de epiderme e mucosa dos tecidos subjacentes.

1.4 PSEUDOCALCIFICAÇÃO: Observa-se esse artefato quando se emprega acetato de cálcio como agente neutralizador em solução de formol a 10%. É difícil distinguir os depósitos de cálcio dos que foram produzidos durante a calcificação in vivo. Daí a possibilidade de se tomar a pseudocalcificação pela calcificação real. As propriedades corantes, com os vários corantes de cálcio, são idênticas às da calcificação real. Pode-se distinguir a pseudocalcificação da calcificação real pelo emprego de uma técnica de coloração com mucossacarídeos (azul alciano ou ferro coloidal de Mowry). A calcificação real produz mucossacarídeos fora das margens periféricas do cálcio, o que não ocorre na pseudocalcificação.

---

* LEE G. LUNA
Chefe, Divisão de Laboratórios de Histopatologia
AFIP, Washington, D.C. 20306

(Anotações preparadas em base de cursos anteriores realizados nos E.U.A. e outros países.)

1.5 CRISTAIS DE CARBONATO DE CÁLCIO: O carbonato de cálcio é frequentemente empregado como neutralizador em soluções fixadoras de formol. Ocorre a cristalização de carbonato de cálcio dentro do espécime em consequência do deslocamento celular. O aspecto pode induzir um erro por se assemelhar a uma reação in vivo. A cristalização do carbonato de cálcio in vitro é diferente da cristalização in vivo. Não se conhece exatamente a razão dessa diferença, mas é possível que se deva à resistência encontrada pelo tecido. Os cristais polarizam-se bem. Os cristais de carbonato de cálcio são muito pouco solúveis em água. Contudo, dissolvem-se rapidamente em água que contenha dióxido de carbono dissolvido, em virtude da conversão em carbonato de hidrogênio, que é mais solúvel. Pode-se determinar a presença de cristais de carbonato de cálcio expondo-se a lâmina ao contacto com água carbonatada ou com água que contenha algumas partículas de gelo seco durante 30 minutos.

1.6 REDUÇÃO DA COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA: Os tecidos expostos por demasiado tempo ao fixador de Zenker não apresentarão as características tintoriais usuais na coloração por hematoxilinas. A exposição excessiva produz uma coloração de aspecto ácido. Não é possível a diferenciação de material da cromatina e os núcleos, de modo geral, não são distintos. Pode-se obter o restabelecimento das propriedades corantes mediante a colocação das lâminas, de um dia para outro, em solução aquosa de bicarbonato de sódio a 20%, depois do que se procederá à coloração de rotina pela H&E.

1.7 CRISTAIS DE CLORETO MERCÚRIO: O cloreto mercúrico, que é um dos ingredientes do fixador de Zenker, é insolúvel em água e álcool. Na forma clássica, os cristais de cloreto mercúrico são esferóides e apresentam periferia irregular. Já se observaram também cristais aculiformes e, muitas vezes, ocorrem cristais polimórficos. O contacto com solução aquosa a 20% de água amoniacal (NH_4OH) durante 30 segundos produz alteração da cor. Cromaticamente, os cristais serão negros.

1.8 POLÍMEROS DE URÉIA: Os polímeros de uréia formam-se em tecidos colocados num fixador semelhante ao de Zenker, que contenha uréia, e posteriormente postos em formol para armazenagem. A uréia é adicionada ao fixador para impedir a hemólise. Microscopicamente, o polímero apresenta uma estrutura cristalina arredondada, entre clara e cinza, em preparações de hematoxilina e eosina. É possível diferenciá-lo do cristal de Zenker pelo fato de não reagir (tornando-se negro) ao tratamento com hidróxido de amônio (ver cristais de cloreto mercúrico). O polímero polariza-se com facilidade. Os cristais de Zenker não se polarizam após o tratamento com NH_4OH. Além disso, os cristais de Zenker parecem situar-se um pouco acima da superfície do tecido, ao passo que o polímero cristalino de uréia é intra tissular e apresenta uma estrutura plana.

1.9 CRISTALIZAÇÃO ERITROCÍTICA: O fixador de Zenker frequentemente provoca a cristalização de eritrócitos. Microscopicamente, as hemácias apresentarão um aspecto transparente ou translúcido. Os eritrócitos apresentarão excelentes propriedades de polarização.

1.10 ALTERAÇÃO MUCOPOLISSACARÍDICA: O formol neutro a 10% com tampão de fosfato não produz qualquer alteração de vulto capaz de afetar as propriedades corantes do ácido hialurônico. O fixador de Zenker tem efeito adverso sobre o ácido hialurônico e não pode ser demonstrado pela coloração. Não se sabe se outras muco-substâncias são afetadas adversamente.

1.11 FIXADOR DE BOUIN: É absolutamente indispensável que não fiquem resíduos de ácido pícrico em tecidos tratados pelo fixador de Bouin. O ácido pícrico residual alterará o tecido e afetará suas propriedades corantes. Com o tempo, quase todas as estruturas celulares estarão deformadas, irreconhecíveis ou obliteradas. Remove-se o ácido pícrico colocando-se o espécime (antes do tratamento) em carbonato de lítio saturado em álcool etílico a 70%, até que haja desaparecido toda a coloração amarela. Os espécimes com 4 mm de espessura estarão prontos para uso em aproximadamente 4 horas.

1.12 CRISTAIS ÁCIDOS: O fixador de Bouin contém formol, ácido acético glacial e trinitrofenol (ácido pícrico) e produz cristais semelhantes aos produzidos pelo formol não tamponado, provavelmente por causa do formol acídico.

2. ARTEFATOS DEVIDOS A IMPREGNAÇÃO E INCLUSÃO

2.1 IMPREGNAÇÃO IMPERFEITA DA PARAFINA: Caracteriza-se pela dispersão, ao se colocarem cortes histológicos em banho-maria. Para identificar a impregnação imperfeita da parafina, deve-se fazer uma incisão no bloco (a fim de expor o tecido) e aplicar um pequeno chumaço de algodão embebido em água à incisão. O tecido que não foi corretamente impregnado tornar-se-á branco.

2.2 "EFEITO DE TERRA QUEIMADA": Morfologicamente, o tecido imperfeitamente impregnado apresentará um aspecto semelhante ao de terra seca ou crestada. Os cortes se dispersam além do normal em banho quente de flutuação, como no caso anterior. A exposição aos xilóis clarificadores da preparação de H&E contrai o corte, e este, ao voltar às dimensões originais, apresenta as rachaduras observadas.

2.3 INCLUSÃO IMPERFEITA: As rachaduras que aparecem em volta dos espécimes de tecido são produzidas pela imperfeita adesão da parafina dentro do espécime e da parafina que o envolve, se o tecido não é prontamente transferido do recipiente de parafina para o molde de inclusão.

2.4 DEFICIÊNCIA DA TÉCNICA DE INCLUSÃO: A prática de orientar imperfeitamente os tecidos durante a inclusão pode causar problemas de corte. Na inclusão múltipla, deve-se proceder à combinação de cortes de tecido no mesmo bloco, segundo seu tipo e densidade. Também é muito importante fazer com que a massa final tenha a forma de um quadrado ou retângulo.

3. ARTEFATOS PROVOCADOS PELO CORTE

3.1 FACA CEGA: As tres características mais importantes de uma faca sem fio são:

A. Os cortes não saem em fita.
B. Os cortes aderem ao bloco durante o curso ascendente do micrótomo.
C. Compressão microscópica das estruturas histológicas.

3.2 EFEITO "DE VENEZIANA": O efeito de "veneziana" (linhas horizontais espessas e delgadas) frequentemente observado em cortes histológicos é devido:

A. ao uso de lâmina sem fio,
B. inclusão de tecido duro e mole no mesmo bloco,
C. parafusos mal apertados do micrótomo.
D. lubrificação deficiente das superfícies móveis do micrótomo.

3.3 EFEITO DE "MORDEDURA DE TRAÇA": O aspecto se caracteriza pelo aparecimento de orifícios de bordas irregulares no corte. O artefato é causado devido à exposição excessiva aos álcoois, xilol e parafina, redundando em endurecimento excessivo do tecido. Ao cortar o bloco de parafina, a navalha do micrótomo provoca estriação do tecido. Pode-se resolver esse problema pela aplicação de um chumaço de algodão embebido em água à superfície de corte do bloco de parafina.

4. OUTROS TIPOS DE ARTEFATO

4.1 SECAGEM DE LÂMINAS: A secagem deficiente (à temperatura ambiente) dos cortes é caracterizada por uma coloração desigual do tecido. Os efeitos se assemelham ao que ocorre quando as lâminas são deixadas no corante durante um tempo insuficiente para que se obtenha uma coloração suficiente. Os cortes histológicos fixados em parafina exigem secagem a quente, seja num aquecedor de lâminas, seja numa estufa.

4.2 CONTAMINAÇÃO BACTERIANA: A gelatina empregada como meio de colagem dos cortes e que se usa dissolvida no banho-maria constitui excelente meio de cultura. O corte histológico será contaminado com bacilos e côcos. Pode-se evitar esse problema lavando-se diariamente o banho-maria com água quente e sabão e secando-o bem após a lavagem.

5. ARTEFATOS COMUNS A COLORAÇÃO COM H&E

5.1 As estruturas cristalinas transparentes que frequentemente se observam em toda a extensão dos cortes podem ser cristais de alumen, que é usado como mordente em várias soluções de hematoxilina. Os cristais indicam que a solução de hematoxilina não foi corretamente misturada, restando o alumen em sua forma cristalina original. A mistura de soluções de hematoxilina exige uma agitação vigorosa, recomendando-se para esse fim um misturador magnético. Os cristais de alumen podem ser facilmente observados na microscopia polarizada. Quando se nota a sua presença, a solução de hematoxilina deve ser descartada. Vários dias após o aparecimento de cristais de alumen, deposita-se um pigmento negro em toda a extensão do corte. A hematina (agente corante da hematoxilina) é precipitada, devido à ausência do alumen que atua como mordente. A presença de alumen e hematina indica decomposição da hematoxilina, resultando em coloração deficiente do corte.

5.2 Muitas vezes, a coloração desigual é devida ao fato de não terem sido as lâminas agitadas várias vezes, dentro da solução corante, antes de descansar durante o período de exposição necessário.

5.3 A desidratação incompleta das lâminas microscópicas é caracterizada por um aspecto cinzento e granuloso do corte histológico. Quando se abaixa o condensador do microscópio, podem-se observar bolhas.

5.4 Não se deve permitir a secagem da lâmina durante a aplicação da lamínula. Isso produzirá um artefato com duas características distintas: (1) um pontilhado que se assemelha a depósito de pigmentos; (2) os núcleos aparecem como estruturas nítidas negras e brilhantes. O diagnóstico deste artefato se faz abaixando-se o condensador do microscópio.

5.5 Quando se usa meio de montagem em excesso e que se deixa engrossar, o tecido apresenta uma aparência nebulosa, quando observado em grande aumento (x 450 ou mais).

TÉCNICA RÁPIDA DE COLORAÇÃO POR H&E

Fixação: Álcool Formo-Metanol

Criotomia: Cortes em congelação, 8 micra

Soluções:

Formol-Metanol

Formol tamponado neutro a 10%	80,0 ml
Metanol absoluto	20,0 ml

Hematoxilina de Bullard

Cristais de hematoxilina	8,0 gm
Álcool a 80%	144,0 ml
Ácido acético glacial	16,0 ml

Dissolver a calor moderado e adicionar a mistura de:

Alume de amônio ou potássio	20,0 gm
Água destilada	250,0 ml

Aquecer até entrar em ebulição, retirar do fogo e lentamente adicionar:

Óxido mercúrio	8,0 gm

Esfriar rapidamente, filtrar e adicionar a mistura de:

Álcool a 95%	275,0 ml
Glicerina	330,0 ml
Ácido acético glacial	18,0 ml
Alume de amônio ou potássio	40,0 gm

Solução de eosina Y-Floxina B

Eosina Y a 1,0% (estoque)

Eosina Y solúvel em água.....	1,0 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Floxina B a 1,0% (estoque)

Floxina B.....	1,0 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Solução para uso

Eosina a 1,0% (estoque).....	100,0 ml
Floxina a 1% (estoque).....	10,0 ml
Álcool a 95%.....	780,0 ml
Ácido acético glacial.....	4,0 ml

Álcool ácido a 1,0%

Álcool a 70%.....	100,0 ml
Ácido clorídrico concentrado.....	1,0 ml

Carbonato de lítio a 1,0%

Carbonato de lítio.....	1,0 gm
Água destilada.....	100,0 ml

Técnica de coloração:

1. Cortes em congelação. Pescar os cortes em lâminas lavadas quimicamente. Manter congelados os cortes até a hora da coloração. Isso inibirá a autólise.
2. Fixar em formol-metanol..... 30 segundos
3. Imergir em água corrente (mudar frequentemente)... 5 banhos
4. Hematoxilina de Bullard..... 1 minuto
5. Imergir em água corrente (mudar frequentemente)... 5 banhos
6. Diferenciar em álcool ácido a 1%..... 1 banho
7. Imergir em água corrente (mudar frequentemente)... 5 banhos
8. Carbonato de lítio a 1%..... 1 banho
9. Imergir em água corrente (mudar frequentemente)... 5 banhos
10. Álcool a 80%..... 3 banhos
11. Eosina-floxina..... 30 segundos
12. Álcool a 95%..... 3 banhos
13. Álcool a 100%..... 3 banhos
14. Álcool a 100%..... 3 banhos
15. Xilol..... 3 banhos
16. Xilol..... 3 banhos
17. Montagem em bálsamo ou Permount

Resultados:

núcleos - azul
citoplasma - rosa a vermelho

Referência: Luna, L.G. e R.J. Verfuerth: Divisão de Laboratórios de Histopatologia, AFIP, Washington, D.C. 20306

CORANTES DE CONTRASTE PARA HEMATOXILINAS

Richar Verfuerth e Lee G. Luna

Divisão de Laboratórios de Histopatologia

Instituto de Patologia das Forças Armadas

Washington, D.C. 20306

Eosina alcoólica

Eosina alcoólica a 1% (estoque)

Eosina Y solúvel em água,..... 1,0 gm

Água destilada..... 20,0 ml

Dissolver e adicionar

Álcool a 95%..... 80,0 ml

Solução de eosina (para uso)

Solução de eosina (estoque)..... 1 parte

Álcool a 80%..... 3 partes

Imediatamente antes de usar, adicionar 0,5 ml de ácido acético glacial a cada 100 ml de corante.

Técnica de coloração:

1. Desparafinar e hidratar os cortes, da maneira usual.
2. Utilizar o corante de hematoxilina desejado (de preferência a hematoxilina de Mayer).
3. Após a lavagem com água, imergir as lâminas em álcool a 80% durante 2 minutos.
4. Corar em solução de eosina (para uso) durante 2 minutos.
5. Desidratar em álcool a 95% e álcool absoluto, duas mudas de 2 minutos cada.
6. Clarificar em xilol, duas mudas de 2 minutos cada.
7. Montagem em bálsamo ou Permount.

Resultados: Citoplasma - rosa claro

Nota: Este corante de contraste produz muito pouca diferenciação cromática das várias estruturas acidofílicas.

Anilina-Cromótropo 2R

Solução de anilina-cromótropo 2R

Cromótropo 2R.....	1,0 gm
Álcool a 80%.....	100,0 ml
Anilina.....	3,0 ml
Ácido acético glacial.....	1,0 ml

Técnica de coloração:

1. Desparafinizar e hidratar, da maneira usual
2. Empregar o corante de hematoxilina desejado (de preferência a hematoxilina de Mayer).
3. Após a última lavagem, corar em solução de anilina-cromótropo 2R durante 10 minutos.
4. Levar em água corrente durante 2 minutos.
5. Desidratar em álcool a 95% e álcool absoluto, duas mudas de 2 minutos cada.
6. Clarificar em xilol, duas mudas de 2 minutos cada.
7. Montar em bálsamo ou Permount.

Resultados:

citoplasma - salmão.

Nota: É difícil descrever os efeitos cromáticos, com este método de coloração. Os eritrócitos têm uma coloração mais escura do que quando são usados outros corantes de contraste. Alguns grânulos, como por exemplo, os grânulos eosinófilos e os mastocitos, etc. coram-se mais distintamente.

Eosina-Floxina-B

Eosina a 1% (estoque)

Eosina Y solúvel em água..... 1,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Floxina-B a 1% (estoque)

Floxina B..... 1,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Solução (para uso) de eosina-floxina-B

Eosina (estoque)..... 100,0 ml

Floxina B (estoque)..... 10,0 ml

Álcool a 95%..... 780,0 ml

Ácido acético glacial..... 5,0 ml

Técnica de coloração:

1. Desparafinizar e hidratar em água, da maneira usual.
2. Empregar o corante de hematoxilina desejado (de preferência, hematoxilina de Mayer).
3. Após a última lavagem, imergir as lâminas em álcool a 80% durante 2 minutos.
4. Corar em solução de eosina-floxina B, durante 2 minutos.
5. Desidratar em álcool a 95% e álcool absoluto, em duas mudas de 2 minutos cada.
6. Clarificar em xilol, em duas mudas de 2 minutos cada.
7. Montar em bálsamo ou Permount.

Resultados:

citoplasma - rosa a rosa avermelhado

Nota: A combinação de eosina e floxina B produz um corante citoplasmático que diferencia cromaticamente muitas estruturas acidofílicas. O tecido muscular, por exemplo, assume coloração pouco mais escura que o colagêno, enquando que os corpos de inclusão demonstram-se mais facilmente que pelo uso apenas de eosina. Muitas estruturas são diferenciadas cromaticamente por este corante de contraste.

Floxina-B Safranina

Ácido pícrico a 2%

Ácido pícrico..... 2,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Floxina-B aquosa a 1,0%

Floxina B..... 1,0 gm

Água destilada..... 100,0 ml

Sáfranina alcoólica a 2,0%

Safranina (Safran du Gatinais*)..... 2,0 gm

Álcool a 100%..... 100,0 ml

Dissolver a safranina em álcool colocando a solução em estufa a 56-60°C. Recomenda-se que a solução seja mantida na estufa durante todo o tempo. O recipiente deve ser bem tampado, para impedir evaporação excessiva.

Técnica de coloração:

1. Desparafinizar e hidratar, da maneira usual.
2. Imergir em ácido pícrico aquoso a 2% durante 5 minutos.
3. Lavar em água corrente, até a completa remoção do ácido pícrico (geralmente 5 minutos)
4. Empregar a hematoxilina desejada (de preferência, hematoxilina de Mayer).
5. Após a última lavagem, corar em solução de floxina B aquosa a 1,0% durante 1 minuto.
6. Lavar em água corrente durante 5 minutos.
7. Colocar as lâminas em tres mudas de álcool absoluto, 2 minutos, cada vez.
8. Corar em safranina alcoólica a 2,0% durante 2 1/2 minutos.
9. Desidratar em duas mudas de álcool absoluto.
10. Passar em dois banhos de xilol de 2 minutos cada.
11. Montagem em bálsamo ou Permount.

* Roboz Surgical Instrument Co., Washington, D.C. 20006

Resultados:

citoplasma - rosa ou amarelo avermelhado

Nota: Este corante de contraste é excelente para coloração de rotina, uma vez que a diferenciação cromática resulta em duas cores distintas. Por exemplo, o colageno assume coloração amarela, ao passo que o tecido muscular se torna vermelho. O valor deste corante de contraste só pode ser aquilatado pela experiência pessoal. A técnica é mais demorada e mais complicada que a da maioria dos contracorantes, mas a diferenciação cromática das várias estruturas histológicas justifica seu emprego.

CORANTE DE HEMATOXILINA-EOSINA DE ZIEGLER
(Corante usual de H&E para uso rápido (10-12 minutos)

O aspecto mais marcante desta técnica de coloração é a introdução do ácido fosfotúngstico como agente diferenciador autolimitador. De modo geral, os resultados são muito mais nítidos quando se usa esse método de diferenciação.

O método descrito é baseado em considerável experiência, que permitiu eliminar dados desnecessários que apareceram em publicação anterior.

Os cortes em parafina, congelação ou esfregaços são preparados da maneira usual. As lâminas são imersas nas soluções corantes na ordem descrita adiante. Na maioria das soluções, mede-se o tempo por imersões. Estas devem ser bastante lentas, levando cerca de um segundo cada. O tempo de imersão nos corantes é mais longo, conforme se indica. Caso seja conveniente, as lâminas podem "descansar" no primeiro e no último xilol. Para obter bons resultados, é importante somente usar álcool absoluto. As lâminas devem ser imersas dez vezes (no mínimo) em cada recipiente, exceto os que contêm corantes.

Técnica de coloração:

1. Xilol
2. Segundo xilol
3. Álcool
4. Segundo álcool
5. Terceiro álcool
6. Solução fisiológica normal
7. Hematoxilina - 1 a 6 minutos
8. Solução fisiológica normal
9. Ácido fosfotúngstico
10. Solução fisiológica normal
11. Citrato de sódio
12. Solução fisiológica normal
13. Eosina - 1 a 2 minutos
14. Álcool
15. Segundo álcool
16. Terceiro álcool
17. Xilol
18. Segundo xilol

Os cortes são montados em meio neutro, e podem ser deixados em xilol até que se proceda à montagem.

A solução fisiológica normal consiste de 0,85% de cloreto de sódio em água destilada (8,5 gramas por litro).

O ácido fosfotúngstico é empregado numa solução em salina normal a 2% em solução fisiológica normal.

Dá-se preferência a hematoxilina de Delafield ou Harris. Caso o corante seja obtido em forma seca, usar corante certificado.

Recomenda-se o uso de solução alcoólica ou aquosa de eosina 2% ou 5%. Preferimos a solução mais forte. O tempo de imersão em eosina não é crítico, podendo variar de meio minuto a dois minutos, conforme os resultados desejados.

Não empregar álcool isopropílico, que provoca descoloração dos cortes histológicos.

As soluções e os corantes devem ser renovados de acordo com a experiência e o volume de trabalho. Os xilóis e álcoois, quando usados por demasiado tempo, deixam água ou parafina nos cortes, comprometendo os detalhes histológicos. Se houver dúvidas quanto ao tempo de uso das soluções, convém testar com algumas lâminas de prova. Os banhos de solução fisiológica normal devem ser mudados frequentemente. Os vasos e recipientes de corantes devem ficar cobertos ou tampados, quando não estão em uso.

Em geral, obtêm-se melhores resultados pela fixação de tecidos em solução neutra de formaldeído.

Após a fixação, pode-se iniciar a coloração de esfregaços citológicos no recipiente número 6. Os cortes congelados, quando fixados na lâmina, podem ir diretamente para o recipiente de hematoxilina, número 7.

Alguns tecnologistas preferem usar três recipientes de xilol em vez de dois, no princípio e no fim da preparação. Essa prática provavelmente prolongará o tempo de uso do xilol.

O tempo médio para a preparação de lâminas por esta técnica é de apenas 10 a 12 minutos. Em virtude desse fato, não é possível adaptá-la para a coloração automatizada. No caso dos cortes de congelação, o tempo de preparação pode ser um pouco reduzido, se todas as soluções e corantes usados foram suficientemente frescos.

Este corante presta-se admiravelmente à diferenciação. Praticamente todas as células e substâncias intercelulares assumirão colorações de diferentes tons e densidades de rosa ou azul-púrpura. Quando o tecnologista se afasta das técnicas descritas, os resultados são usualmente deficientes.

Após a publicação da comunicação original (1), Thompkins e Miller desenvolveram um Corante Hematoxilina-férrica e Ácido Fosfotúngstico, para protozoários (2).

Lichtenstein (3) recomenda o método de Ziegler para estudos neuropatológicos.

Referências:

1. Ziegler, E.E. Hematoxylin-Eosin Tissue Stain, Arch. Path., Jan. 1944, 37:68-69

2. Thompkins, V.N., e J.K. Miller. Staining Intestinal Protozoa with Iron-Hematoxylin-Phosphotungstic Acid, Am. J. Clin. Path., 17: 755-58, Sept. 1947

3. Lichtenstein, B.W. A Textbook of Neuropathology, W.B. Saunders Co., 1949, pp. 427, 448, 449. 1-28-73.

LISTA DE MATERIAIS PARA

HISTOTECNOLOGIA

CITOLOGIA

AUTOPSIA

DR. H. TORLONI
Departamento de Promoção e Coordenação de Pesquisas
ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE
525 Twenty-Third Street, N.W.
Washington, D.C. 20037

CHEMICALS

QUANTITY	FISHER'74 CATALOG	SIZE	DESCRIPTION	ITEM No.	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
1	H 345	100g	Hematoxylin certified	1	$	$ 54.48
	S 322	1/4 lb	Sodium iodate certified	2		5.56
1	A 567	1 lb	Ammonium alum certified	3		2.98
1	A 104	1 lb	Citric acid certified	4		3.54
1	C 286	1 lb	Chloral hydrate lab grade Bureau of Narcotics and Dangerous Drugs License must be supplied for above item as per U.S. Gov. regulations.	5		4.55
1	A 567	1 lb	Ammonium alum certified	6		2.98
1	M 174	1 oz	Mercuric oxide (red) certified	7		4.13
2	A 38	1 pt	Glacial acetic acid	8	2.92	5.84
1	A 669	1 pt	Ammonium hydroxide a.reag	9		1.76
1	I 88	1/4 lb	Ferric chloride cert	10		1.65
2	A 144	1 pt	Hydrochloric acid (concentrated)	11	2.64	5.28
2	E 511	10g	Eosin Y (H2) soluble certified	12	1.50	3.00
1	P 387	25g	Phloxine B certified	13		5.90
2	F 98	10g	Basic Fuchsin cert	14	1.68	3.36
1	M 291	25g	Methylene blue certif.	15		2.87
1		1 gal	70% alcohol reagent	16		8.00
1	A 740	1 pt	aniline cert	17		2.28
1	A 91	1 lb	Phenol crystals, lab grade	18		4.77

QUANTITY	FISHER'74 CATALOG	SIZE	DESCRIPTION	ITEM No.	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
1		1 gal	30% alcohol reagent	19		8.00
1	I 36	1/4 lb	Iodine lab grade reagent	20		5.04
1	P 410	1/4 lb	Potassium iodide certif reagent	21		3.33
2	C 581	10 g	Gentian violet (crystal violet)	22	1.36	2.72
1		1 pt	Absolute ethyl alcohol 1 cs = 24 x 1 pt pure	23		49.99
1	S 74339	1 pt	Formalin (37-40%) (formaldehyde)	24		1.40
1	So A 134	1 pt	Picric acid (saturated aqueous) solution	25		2.20
1	MBBX 620	25 g	BieBrich scarlet	26		3.57
1	F 97	25 g	Acid Fuchsin certif	27		2.47
1	A 237	1/4 lb	Phosphomolybdic acid cert a.r.	28		14.06
1	A 248	1 oz	Phosphotungstic acid cert a.r.	29		6.64
1	A 967	25 g	Aniline blue cert	30		3.19
2	MBOX 160-5		Oil Red O	31	1.12	2.24
1	P 354	1 gal	Propylene glycol 99.3% minimum lab grade reagent	32		10.41
1	B 11868	1 lb	Gelatin (Bacteriological)	33		3.74
2	G 32	1 pt	Glycerin lab grade reagent	34	3.37	6.74
1	A 100	1/4 lb	Chromic acid certif a. reagent	35		3.29
1	P 197	1 lb	Potassium metabisulfite cert	36		4.32

QUANTITY	FISHER '74 CATALOG	SIZE	DESCRIPTION	ITEM No.	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
2	D 127	1 lb	Activated charcoal (carbon)	37	4.21	8.42
1	198	500 g	Paraldehyde highest purity (standard size) *Bureau of Narcotics and Dangerous Drugs registration number must be supplied as per U.S. Gov. regulation for paraldehyde	38		13.69
1	MBMX 430	25 g	Metanil yellow	39		3.54
1	A 100	1/4 lb	Chromic acid certified	40		3.29
1	S 654	1 lb	Sodium bisulfite cert	41		3.17
1	S 181	1 oz	Silver nitrate cert	42		6.71
1	H 289	1 lb	Methenamine (Hexamethylenatetramine)	43		3.65
1	S 248	1 lb	Borax sodium borate tetra cert	44		2.07
1	G 54	1/8 oz	Gold Chloride tri reagent 1 cs= 6 x 15 grains	45		52.50
1	S 445	1 lb	Sodium thiosulfate (hypo) cert a.r.	46		1.76
1	So A 48	1 pt	Hydrochloric acid (normal) 1N	47		1.76
4	D 22	1/4 lb	Diastase of Malt	48	3.37	13.48
1	A 223	1 oz	Periodic acid reagent	49		3.04
1	L 176	25 g	Light green SF yellowish cert	50		3.52
1	P 236	1 lb	Potassium Ferrocyanide certif	51		3.93
4		5 g	Kernechtrot (nuclear fast red)	52	13.07	52.28

QUANTITY	FISHER '74 CATALOG	SIZE	DESCRIPTION	ITEM No.	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
1		1 gal	20% alcohol	53		8.00
1	C 579	25 g	Carmine cert	54		8.54
1	A 575	1/4 lb	Aluminum chloride anhydrous	55		3.11
1		1 gal	50% alcohol reagent grade	56		8.00
1	M 156	1/4 lb	Mercuric chloride a. reagent	57		9.33
1	S 77426	1/4 lb	Potassium dichromate a. reagent cert	58		2.56
1	S 419	1 lb	Sodium sulfate certif a. reagent	59		2.40
1	9637-P	25 g	Luxol fast blue MBSN	60		4.05
5		1 gal	95% ethyl alcohol pure	61	25.50	127.50
2	MBCX 2065	10 g	Cresyl echt violet (cresyl violet acetate)	62	14.44	28.88
1	L 119	1/4 lb	Lithium carbonate certif	63		4.90
1		25 g	Silver protein string (protargol) proteinate d'argent certif stain	64		9.68
2	C 430	1 lb	(cleaned) copper shot certif a.r.	65	8.05	16.10
1	H 329	1/4 lb	Hydroquinone	66		1.18
1	A 219	1 lb	Oxalic acid certif a.r.	67		3.38
1	S 209	1 lb	Sodium acetate certif	68		2.71
2	E 511	10 g	Eosin Y certif	69	1.50	3.00
1	MBNX 150	25 g	Naphthol green B	70		4.03

QUANTITY	FISHER '74 CATALOG	SIZE	DESCRIPTION	ITEM No.	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
1	S 181	1 oz	Silver nitrate certif reagent	71		6.71
1	P 250	1 lb	Potassium hydroxide cert a.r.	72		2.42
2	I 75	1/4 lb	Ferric ammonium sulfate cert	73	1.53	3.06
1	SoF 98	1 gal	10% (formaldehyde) formalin	74		8.80
1		1 lb	Hydroquinone crystals (photo-graphic quality)	75		4.80
1		25 g	Orange -OG6 (Papanicolaou)	76		18.48
2	SoP 11	1 pt	Papanicolau stain EA 50 (equal to Harleco)	77	5.97	11.94
1	A 388	1/4 lb	Albumen powder	78		4.11
4		25 g	Harris Hematoxylin	79	36.00	144.00
1	S 263	1 lb	Sodium carbonate certif	80		3.22
1		16 oz	Carbol Xylene (Weigert)	81		4.55
6 case	SoC 190	1 qt	Cal-Ex Decalcifying solution	82	4.90	29.40
1	X 4	1 gal	Xylene	83		5.77
6	SoP 15	1 pt	Permaunt	84	3.50	21.00
1	A 388	1 lb	Albumin egg powder	85		14.28

QUANTITY	HARLECO #12 CATALOG	SIZE	DESCRIPTION	ITEM No.	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
1	140	25 g	Azure II, Giemsa	86		$ 12.60
1	766 H	16 oz	Canada Balsam (filtered)	87		16.75
1	776 H	4 oz	Cedarowood oil (ref. index 1.515)	88		2.35
1	692 H	16 oz	Methylene blue (Terry formula)	89		8.40
1	3878 H	32 oz	Nitric acid normal	90		5.00
1	3801 H	25 g	Saffron (Spanish)	91		24.00
1	1316 E H	32 oz	Sulphuric acid	92		3.00
	LIPSHAW (1973) CATALOG					
1	NA 0777		NAFT stain set	93		27.00
					TOTAL	$1,062.08

ITEM No.	QUANTITY	FISHER'74 CATALOG	DESCRIPTION	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
1	1	11590	Alcohol hydrometer		$ 3.45
2	1	13-380 C	Red pencil		3.60
3	1	13-380 D	Black pencil		3.60
4	1	7-965 A	Porcelain crucible 5ml		.28
5	1	7-965 E	Porcelain crucible 30ml		.77
6	1	8-552-10 A	Graduated cylinder 10ml		2.79
7	1	8-553 A	Graduated cylinder 50ml		11.53
8	1	8-553 B	Graduated cylinder 100ml		12.27
9	1	8-532 A	Ungraduated cylinder 100ml		2.65
10	2	8-532 B	Ungraduated cylinder 250ml		3.52
11	1	8-532 C	Ungraduated cylinder 500ml		4.20
12	1	10-090	Erlenmeyer flask 250ml	12= 8.64	8.64
13	1	10-090 C	Erlenmeyer flask 500ml	6= 5.64	5.64
14	1	12-960 B	Mortar 80mm		1.63
15	2	13-665 A	Mohr pipets 1/10(white)	1.25	2.50
16	2	13-665 F	Mohr pipets 1ml(yellow)	1.27	2.54
17	2	13-665 K	Mohr pipets 5ml(blue)	1.41	2.82
18	2	13-665 M	Mohr pipets 10ml(orange)	1.52	3.04
19	2	13-665 N	Mohr pipets 25ml(white)	2.10	4.20
20	1	5-772	Buret clamp 1 1/2"		2.50

ITEM No.	QUANTITY	FISHER'74 CATALOG	DESCRIPTION	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
21	1	5-777	Buret clamp 2 1/4"		3.75
22	1	5-850 A	Flat jaw pinchcocks 3/8"	12= 5.04	5.04
23	1	5-850 B	Flat jaw pinchcocks 5/8"	12= 5.52	5.52
24	1	14-670 C	Support stand 6 x 9"		4.70
25	1	14-750	Ring support		3.65
26	1	4-254 B	Alcohol burner 250ml		2.15
27	1	15-300 B	Tripod 4 3/16"		2.60
28	1	15-585 B	Nickel-chromium wise gauze 5 x 5"	6= 5.60	5.60
29	2	10-295	Forceps cover-glasses	1.10	2.20
		A. THOMAS'74 CATALOG			
30	1 pkg	1530-L06	Beaker 1ml		7.32
31	1 pkg	1530-L16	Beaker 5ml		7.32
32	1 pkg	1530-L26	Beaker 10ml		7.32
33	1 pkg	1530-L66	Beaker 50ml		6.24
34	1 pkg	1530-M21	Beaker 400ml		7.44
35	1 pkg	1530-M51	Beaker 1,000ml		9.06
36	6	1739-N10	Bottles 30ml	.85	5.10

ITEM No.	QUANTITY	A. THOMAS '74 CATALOG	DESCRIPTION	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
37	3	1739-N20	Bottles 60ml	.99	2.97
38	2 cases	1739-N33	Bottles 125ml	37.58	75.16
39	1 case	1739-N43	Bottles 250ml		32.18
40	1 case	1739-N53	Bottles 500ml		21.92
41	1 case	1739-N63	Bottles 1,000ml		32.51
42	1 case	1739-N73	Bottles 2,000ml		30.35
43	12	1739-Q20	Bottles 125ml (amber)	1.40	16.80
44	6	1739-Q40	Bottles 500ml (amber)	2.43	14.58
45	2	1753-A20	Bottles 2 liter	30.21	60.42
46	4		Stopper for bottles (1753-A20)		
47	1	1754-B10	Bottle balsam		1.88
48	1	1766-M10	Immersion oil bottle		6.15
49	4	1764-S20	Bottles dropping 60ml	1.13	4.52
50	4	1764-T30	Bottles dropping 125ml (amber)	1.86	7.44
51	1	5229-H65	Funnel heater		30.00
52	1 pkg	6180-H28	Jar 16oz		5.72
		LIPSHAW (1973) CATALOG			
53	24	122	Staining dish	30.00	60.00

ITEM No.	QUANTITY	LIPSHAW (1973) CATALOG	DESCRIPTION	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
54	24	123	Cover	16.50	33.00
55	3	113	Rack and handle for 24 slides	6.75	20.25
56	12	140	Vertical staining jar complete		22.50
				TOTAL	$ 646.53

EQUIPMENT

ITEM No.	QUANTITY	FISHER '74 CATALOG	DESCRIPTION	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
1	1	12-601	AO-820 Microtome (paraffin)		$1,254.00
2	1	12-618	AO-880 Microtome (frozen)		403.00
3	1	12-626	Freesing attachments		63.00
4	1	15-182-200	Tissuematon		1,650.00
5	1	15-182-210	Melting pot		83.00
6	2	15-182-225	Basket	20.80	41.60
7	2	15-182-227	Stirrer-cage	21.80	43.60
8	1	15-182-218	Tissue capsules	1,000= 37.45	37.45
9	6	12-634 B	Microtome knife 120mm	37.00	222.00
10	2	12-634-10A	Knife handle	11.00	22.00
11	2	12-634-5B	Knife back	4.50	9.00
		HACKER INSTRUMENTS CATALOG			
12	1	MK4	PERMA-SHARP Microtome Knife Sharpener Standard Model		1,595.00
13	1	MKS 87	Dressing Fixture, diamond tipped, for trueing honing wheels		180.00
14	4	MKS 5	Honing wheel	40.00	180.00
15	4	MKS 6	Stropping wheel	40.00	180.00

ITEM No.	QUANTITY	LIPSHAW (1973) CATALOG	DESCRIPTION	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
1	1	304	Manual processing unit		295.00
2	1	375	Tissue float bath		52.00
3	6	A 1906	Kehne forceps	.90	5.40
4	1	371	Micro slide warming table		31.50
				TOTAL	$6,347.55

N.B.: This list does not include· Ovens, autopsy table, cadaver refrigerator, and analytical balance.

STANDARD 18 MICROSCOPE

ITEM No.	QUANTITY	ZEISS CATALOG	DESCRIPTION	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
1	1	470918-9901	Stand		$ 244.00
2	1	467058	Diaphragm insert		244.00
3	1	473150	Revolving nose vise (5)		84.00
4	1	473060	Magnification changer		
5	1	473423	Mechanical stage		281.00
6	1	479300	Plastic cover		3.30
7	1	467826	Neutral filter NG9		9.00
8	1	467835	Blue glass clear		3.50
9	1	473026	Binocular tube (Photo tube)		646.00
10	1	460110	Objective: 2.5-0.08 PLANACHR		100.00
11	1	460310	Objective: 6.3-0.16 PLANACHR		124.00
12	1	460510	Objective: 16-0.35 PLANACHR		164.00
13	1	460710	Objective: 40-0.65 PLANACHR		312.00
14	1	461910	Objective: 100-1.25 PLANACHR		544.00
15	1	465253	Condenser 1.3Z with swing front lens		120.00
16	1	462960	Objective marker		191.00
17	1	410015	Wooden case		36.00
18	1	476037/9901	Manual shutter		132.00
19	1	474202	Ikophot MCDS miter		114.00

ITEM No.	QUANTITY	ZEISS CATALOG	DESCRIPTION	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
20	1	476010	Basic unit I		176.00
21	1	466001	Connecting ring		35.00
22	1	476070/9901	C-35 Camera		141.00
23	2	464042	Eyepieces Kpl 10x	89.00	178.00
24	1	392565	Transformer, with ammeter 120VA		160.00
25	1	466025	Focusing eye piece		155.00
26	1	476096	Double cable		27.00
27	1	476052	CR120 Attachment		326.00
28	1	476086	Linhof-back (56 x 72 mm)		263.00
29	3	380018/2520	Bulbes 12V 60W	8.70	26.10
30	1	467257	Lamp housing 12V, 60W/[illegible] collector		100.00
31	1	467040	Connecting tube		27.00
32	1	467252	Filter holder (32 mm)		2.00
33	1	468015	Lamp socket 12V/60W		90.00
34	1	467800	BG23 Blue filter		7.00
35	1	467810	GG14 Yellow filter		7.00
36	1	467805	VG9 Green filter		7.00
37	1	467815	OG3 Orange filter		7.00
38	1	467820	RG2 Red filter		7.00

ITEM No.	QUANTITY	ZEISS CATALOG	DESCRIPTION	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
39	1	467286	Riser Plate		$ 41.00
40	1	380074-0160	Power cable, input-output		4.50
41	1	470861	Centerable carrier w/aux. lens		74.00
42	1	464020	Eyepiece Kpl 10x		57.00
43	1	476025/0U34	Objective lens in mount		49.00
				TOTAL	$4,281.40
		LEITZ CATALOG	LANTERN SLIDE PROJECTOR		
44	1	590051	Leitz Micro Promar		1.931.00
45	1	37005	90mm colorphan - f/2.5		72.00
46	1	32402	Front assembly		16.50
47	1	37872	Illuminating system		18.00
48	1	37218	Field condenser		15.00
49	1	37869	Heat filter		8.10
50	1	37849	Slide changer 2 x 2"		9.60
51	1	37119	Focusing sleve		10.50
52	1	37868	Filter strip attachment		30.00
53	4	37723	24V-250W Halogen lamp	7.50	30.00
				TOTAL	$2, 140. 70

PHOTOGRAPHIC EQUIPMENT

ITEM No.	QUANTITY	NIKON CATALOG	DESCRIPTION	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
1	1	1651	Nikon Photomic F2-S body		650.00
2	1	250	55mm Auto-Micro-Nikkor-P w/M-2 ring		254.00
3	1	2311	Right Angle Finder, Photomic T, TN, FTN		38.50
4	1	2602	Bellows attachment IV		179.50
5	1	2633	Slide copy attachment for Bellows IV		87.50
6	1	664	Cable release		4.95
7	1		460 Electronic Phlash		79.95
8	1		Copy stand		49.95
9	6		Photoflood bulb	1.00	6.00
				TOTAL	$1,350.35

AUTOPSY MATERIAL

ITEM No.	QUANTITY	LIPSHAW (1973) CATALOG	DESCRIPTION	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
1	1	450	Electric autopsy saw	$	$ 145.00
2	1	451	Autopsy saw standard		60.00
3	2	1002-105	Spinal column blade	10.00	20.00
4	2	1002-100	Large blade	10.00	20.00
5	1	751	250mm long knife		15.00
6	1	752	200mm long knife		12.00
7	1	753	150mm long knife		9.50
8	1	748	Post mortem knife (Gannett)		19.00
9	12	745	Scalpel		40.00
10	1	714-A	180mm Double edge knife		15.00
11	1	733	Knife, rib cutting		17.00
12	6	630/SS	6" Forceps	2.00	12.00
13	6	670/SS	6" Forceps (teeth)	3.70	22.20
14	1	502/SS	Rib shear		39.00
15	2	B868	Mayo scissors (straight) 6 3/4"	5.00	10.00
16	2	B870	Mayo scissors (curve) 6 3/4"	7.40	14.80
17	1	A902	Enterotomy scissors		10.50
18	4	A100	Director groove	1.00	4.00
19	2	A101	Flexible, director	.50	1.00

ITEM No.	QUANTITY	LIPSHAW (1973) CATALOG	DESCRIPTION	UNIT PRICE	TOTAL PRICE
20	6	514C	Rochester - Oschnew curved 8"	10.00	60.00
21	6	515	Rochester pean straight 8"	9.00	54.00
22	1	510	Hammer with hook		17.00
23	1	607	Virchow's skull breaker		11.50
24	12	411	Assorted needles		4.50
25	1	400R	Bone saw		20.00
26	1	A 906	Iris scissors 4 1/2"		7.00
27	1	806	Scale 2kg x 10gr		78.00
28	1	204	Hand sealer up to 6"		21.00
29	5	842	Polyethylene bags 6" x 8"	5.00	25.00
30	3	843	Polyethylene bags 8" x 11"	7.50	22.50
31	5	840	Polyethylene bags 3" x 5"	3.00	15.00
				TOTAL	$721.50